



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MATEUS DA ROSA NUNES PAIVA

**Desenvolvimento e caracterização de uma linhagem de  
*Yarrowia lipolytica* para o consumo de xilose através da  
expressão heteróloga do gene de xilose isomerase de  
*Piromyces* (Strain E2)**

**Development and characterization of an *Yarrowia lipolytica*  
strain for xylose consumption through heterologous  
expression of xylose isomerase gene from *Piromyces*  
(Strain E2)**

CAMPINAS

2017

**MATEUS DA ROSA NUNES PAIVA**

**“Desenvolvimento e caracterização de uma linhagem de *Yarrowia lipolytica* para o consumo de xilose através da expressão heteróloga do gene de xilose isomerase de *Piromyces* (Strain E2)”**

**Development and characterization of an *Yarrowia lipolytica* strain for xylose consumption through heterologous expression of xylose isomerase gene from *Piromyces* (Strain E2)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área Genética de Microrganismos.

*Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters in Genetics and Molecular Biology, in the Microorganisms field*

**Orientador:** Prof. Dr. Fabio Papes

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO MATEUS DA ROSA NUNES PAIVA E ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO PAPES.

**CAMPINAS**

**2017**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P166d

Paiva, Mateus da Rosa Nunes, 1992-

Desenvolvimento e caracterização de uma linhagem de *Yarrowia lipolytica* para o consumo de xilose através da expressão heteróloga do gene de xilose isomerase de *Piromyces* (Strain E2) / Mateus da Rosa Nunes Paiva. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Fabio Papes.

Coorientador: Bruno Vaz de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

1. *Yarrowia lipolytica*. 2. *Piromyces*. 3. Xilose. 4. Xilose isomerase. 5. Lipídeos. I. Papes, Fabio, 1975-. II. Oliveira, Bruno Vaz de, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development and characterization of an *Yarrowia lipolytica* strain for xylose consumption through heterologous expression of xylose isomerase gene from *Piromyces* (Strain E2)

**Palavras-chave em inglês:**

*Yarrowia lipolytica*

*Piromyces*

Xylose

Xylose isomerase

Lipids

**Área de concentração:** Genética de Microrganismos

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Fabio Papes [Orientador]

Marcelo Brocchi

Jaciane Lutz Ienzack

**Data de defesa:** 23 de fevereiro de 2017

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 23 de fevereiro de 2017.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Fabio Papes

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienzack

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

**“Sometimes in life you don't always feel like a winner,  
but that doesn't mean you're not a winner,  
you want to be like yourself.”**

Stefani Joanne Angelina Germanotta, “Lady Gaga”

## AGRADECIMENTOS

À minha família, com destaque para a minha mãe Leni da Rosa Nunes Paiva, meu pai Benedito Nunes Paiva, e meus irmãos Lucas da Rosa Nunes Paiva e Gabriel da Rosa Nunes Paiva, que me mostraram que, apesar da ocorrência de períodos turbulentos e águas caudalosas em relações pessoais e na vida, são períodos que certamente serão superados e aprendizados serão obtidos. Agradeço também o apoio, os momentos de conversa, paciência, conselhos, lições ensinadas, ajuda e amor que tive durante toda a minha vida, e principalmente durante o mestrado, no qual eu certamente não estaria se não tivesse sido estimulado e encorajado por eles.

Agradeço em especial a Bruno Vaz (*in memoriam*), pós-doutorando que me acompanhou e ensinou todas as técnicas de biologia molecular e microbiologia, desde 2012 até 2016, mas que foi muito mais que um co-orientador. Ele é o responsável por meu desenvolvimento pessoal nos últimos cinco anos de formação acadêmica, principalmente no que diz respeito ao meu valor enquanto pesquisador, profissional e pessoa, com conselhos valiosos sobre a vida. Sua amizade, atenção, ajuda, e criatividade eram e sempre serão inspirações para meu futuro na Academia, além de diversas outras virtudes com as quais ele me agraciou ao longo dos últimos anos.

À Natália Miyaguti Ângelo da Silva, Isabel Bento Vidal e Fellipe Mello, amigos que sempre estiveram presentes ao longo da minha história acadêmica na Unicamp. Aos três agradeço a disponibilidade e disposição para conversas e desabafos e seu apoio, estímulo e encorajamento aos projetos paralelos que decidi seguir, com destaque para a licenciatura; à Natália, agradeço a companhia quase diária desde 2012, incluindo passeios, conversas, grandes conselhos profissionais dados por ela que refletiram a experiência acumulada por sua própria trajetória acadêmica, além de apoio pessoal e por ser voz da razão em muitos momentos; à Isabel, agradeço a longa amizade desde 2009, sempre estando disponível para conversas e aconselhamentos pessoais, se constituindo como pedra fundadora e parceria da minha vida em Campinas; ao Fellipe Mello, agradeço a companhia diária, sendo principalmente um grande apoio e alívio no mesmo laboratório no qual desenvolvi meu trabalho de mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Papes, e ao Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Ao primeiro, pela orientação e conhecimentos valiosos em

muitas etapas de meu trabalho, certamente frutos de sua exemplar carreira acadêmico-científica, e também pelos conselhos e momentos de conversa pessoal sobre a vida, demonstrando grande tato, delicadeza e preocupação por seus orientados. Ao último, agradeço à energia e motivação que, embora pontuais, serviram bem para me manter estimulado por um bom tempo durante o trabalho; devo também agradecer a ele por ter me dado desde 2012 a possibilidade de me apaixonar e perceber a importância pela docência, ao confiar a mim diversas responsabilidades das disciplinas de Genética para a graduação em Ciências Biológicas e Farmácia na Unicamp.

Agradeço especialmente Gabriel Fiorin e Beatriz Temer, os dois colegas de trabalho que mais me ajudaram ao longo da minha iniciação científica e mestrado, principalmente a partir de 2016. Sem a ajuda intelectual de ambos, a paciência, a disponibilidade e bom-grado ao ensinar, muitas etapas teriam sido intransponíveis, além da companhia agradável dos dois ao longo dos meus dias no laboratório.

Agradeço ao corpo de trabalho do Laboratório de Genômica e Expressão, a saber: Ana Carolina Deckmann, Luciana Souto Mofatto, Thamy Corrêa, Barbara Aliende, Michelle de Assis, Thais Gabrielle Silva, Gabriel Santello, Welbe Bragança, Ernestina Aparecida Rosa, Giselle de Arruda Rodrigues, Leandro Costa do Nascimento, Eliane Laranja Dias, Renata Baroni, Elaine Soligo Arruda, Antônio Pedro Camargo, Guilherme Borelli, Gislaine Marquesim, Bruna Nikagawa, Alessandro Coradini, Gleidson Silva Texeira, Cidnei Marschalk, Juliana José, Bianca Curzio, Carla da Silva, Daniela Thomazella, Eddy Patrícia Lopez, Fábio Raya, Guilherme Ziegler Trintinalia, Gustavo Costa, Igor Oliveira, João Ribeiro Bueno, Juliana Galhardo, Karina Yanagui, Lucas Miguel de Carvalho, Marcelo Falsarella, Mario Ramos Barsottini, Monique Furlan, Nicholas Vinícius Silva, Paulo Henrique Netto, Paulo Tokimatu, Pedro de Gusmão Ribeiro, Sebastian Holzner, Sheila Tagamatsu, Sílvia Missawa, Thiago Seike Nakahara, Vinicius Miessler Carvalho e Ana Paula Ferreira, pela companhia diária e ajuda, tanto pessoal quanto estrutural, sem a qual nenhum trabalho seria possível.

Por fim, agradeço ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e à CNPQ (processo 132043/2015-7), por toda a estrutura física, condições adequadas para o desenvolvimento da pesquisa e pelo apoio financeiro, que possibilitou minha continuidade na vida acadêmica.

## RESUMO

Atualmente, tem-se interesse na manipulação do genoma de micro-organismos para benefício do ser humano, especialmente para a produção de compostos de valor econômico. Além disso, processos para a substituição de produtos energéticos derivados do petróleo possuem grande importância. Sabe-se que alguns desses derivados podem ser substituídos por ácidos graxos obtidos de micro-organismos acumuladores de lipídeos. A levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir altos níveis de lipídeos, sendo considerada modelo em pesquisas com micro-organismos oleogênicos, pois é de fácil cultivo, possui metabolismo de vias lipogênicas já descrito e é passível de manipulação genética. Via-de-regra, micro-organismos com potencial de interesse comercial utilizam hexoses, como glicose e frutose, como fontes de carbono. No entanto, outra fonte de carbono que encontra grande interesse atual para processos bioquímicos industriais é a xilose, açúcar de cinco carbonos (pentose), por sua grande disponibilidade de obtenção a partir de material lignocelulósico, sendo, portanto, de baixo custo. Há micro-organismos naturalmente capazes de consumir xilose, através de duas vias, a saber, a oxirredutiva, compartilhada por fungos, e a via da xilose isomerase, presente em bactérias. *Saccharomyces cerevisiae* já foi manipulada em ambas as vias, levando a um aumento significativo no consumo de xilose e melhoria de seu uso em vários processos industriais. O presente projeto propôs o desenvolvimento de linhagens de *Y. lipolytica*, uma levedura oleogênica, para que esta seja capaz de consumir xilose, obtendo transformantes contendo genes de xilose isomerase bacterianos. Nossos resultados preliminares apontam que esta modificação se mostrou capaz de levar à produção de óleos quando há consumo de xilose, com valores de consumo da pentose de até 90% do total presente no meio, apontando a possibilidade futuro uso destas leveduras em processos industriais para produção de óleos e derivados a partir de fonte de carbono do tipo lignocelulósico (principalmente pelos resultados de crescimento, consumo de xilose e glicose e produção de massa lipídica e massa seca). Outros dados indicam que o acúmulo absoluto de lipídeos em meio com 100x menos nitrogênio do que os tradicionais, em massa seca, é tênue, com todas as linhagens obtidas acumulando de 10% a 30% de lipídeos, indicando que experimentos adicionais devem ser conduzidos para tornar essa espécie uma efetiva plataforma biotecnológica para a produção de oleoquímicos derivados de origem lignocelulósica.



## ABSTRACT

The manipulation of genomes of microorganisms for human interests, especially for obtaining valuable compounds, is a very significant field. Therefore, processes for the substitution of petroleum-derived energetic products have fundamental relevance. It is known that some of these products can be substituted by fatty acids obtained from microorganisms that accumulate lipids. The yeast *Yarrowia lipolytica* can produce high levels of lipids, and it is the model species used in research focusing on oil-producing microorganisms, due to ease of growing and genetic manipulation. Usually, microorganisms of commercial interest use hexoses, such as glucose and fructose, as their energy sources; however, xylose, a five carbon monosaccharide, is a carbon substrate with great interest for industrial processes because it can be easily obtained from biomass-derived lignocellulosic material. The creation of microorganisms capable of consuming both hexoses and pentoses are the focus of many projects. There are microorganisms naturally capable of consuming xyloses through two distinct metabolic pathways: the oxi-reductive one, present in fungal species, and the xylose isomerase pathway, present in bacteria. *Saccharomyces cerevisiae* had been manipulated in both pathways, giving rise to strain with higher xylose consumption levels, improving its use in industrial processes. This project aim was the development of *Y. lipolytica* strains with increased xylose consumption capacity, through the generation of genetically modified strains developed by the insertion of bacterial xylose isomerase genes in their genome. At the end of this project, the genetic manipulations had been successful in the high lipid synthesis and accumulation from xylose, pointing towards a future where *Yarrowia lipolytica* could be used as a biotechnological platform for oleochemicals production from lignocellulosic substrate in an industrial scale (mainly because of the growth, xylose and glucose consumption levels and lipid and dry cell masses); in another side, some problematic results point towards new ways and experiments in need of making, so this yeast can finally be an effective microorganism for the production of oils and derivatives by using lignocellulosic carbon sources.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução e Justificativa.....</b>	<b>12</b>
1.1: Matéria-prima e energia derivadas de petróleo: o desequilíbrio atual e a petroquímica verde.....	12
1.2: <i>Yarrowia lipolytica</i> como microrganismo de interesse industrial.....	14
1.3: Xilose e outros açúcares de cinco carbonos (C5) e seu consumo por <i>Y. lipolytica</i> .....	18
1.4: Vias de consumo de xilose.....	20
1.5: Modificações genéticas para o consumo de xilose em leveduras .....	21
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Material e métodos. ....</b>	<b>25</b>
3.1: Material biológico .....	25
3.2: Meios de cultura.....	25
3.3: Condições de cultivo .....	26
3.4: Plasmídeos .....	26
3.5: Extração de DNA genômico de <i>Y. lipolytica</i> .....	27
3.6: Extração de RNA total de <i>Y. lipolytica</i> .....	28
3.7: Síntese de Cdna a partir do RNA extraído .....	28
3.8: Extração de DNA plasmidial em mini escala (Miniprep) .....	29
3.9: Preparação de bactérias eletrocompetentes.....	29
3.10 : Transformação de <i>E. coli</i> (eletroporação) .....	30
3.11 : Transformação de <i>Y. lipolytica</i> (kit YLEX) .....	30
3.12 : Oligonucleotídeos iniciadores .....	31
3.13 : Construção do cassete pYLEX+XylA .....	31
3.14 : Amplificações através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	32
3.15 : Condições das eletroforeses .....	33
3.16 : Condições dos cultivos de <i>Y. lipolytica</i> .....	33
3.17 : Análise do consumo de glicose e xilose.....	34
3.18 : Extração de lipídeos .....	34

<b>4. Resultados e Discussão.</b>	<b>36</b>
4.1: Seleção dos genes <i>XylA</i> de interesse para expressão em <i>Y. lipolytica</i> .....	36
4.2: Síntese do gene <i>XylA</i> com <i>códon usage</i> otimizado .....	36
4.3: Construção do cassete de expressão heteróloga pYLEX+ <i>XylA</i> .....	39
4.4: Transformação de <i>Y. lipolytica</i> <i>Po1g</i> com o cassete de expressão .....	42
4.5: Análises para confirmar a inserção do gene no genoma e sua expressão: extração de DNA cromossomal e RNA total.....	44
4.6: Testes fenotípicos: curvas de crescimento .....	46
4.7: Testes fenotípicos: consumo de glicose e xilose .....	51
4.7.1 : <i>Discussão: o consumo de glicose</i> .....	51
4.7.2 : <i>Discussão: o consumo de xilose</i> .....	61
4.8: Testes fenotípicos: produção de lipídeos .....	62
4.8.1 : <i>Discussão: as similaridades e diferenças na síntese de lipídeos entre a Po1g Nativa e as Po1g Transformantes</i> .....	73
4.8.2 : <i>Discussão: as similaridades e diferenças na produção de massa seca total entre a Po1g Nativa e as Po1g Transformantes</i> .....	75
4.8.3 : <i>Discussão: as similaridades e diferenças nas porcentagens de lipídeos em relação à massa seca total entre a Po1g Nativa e as Po1g Transformantes</i> .....	78
<b>5. Conclusão.</b>	<b>82</b>
<b>6. Perspectivas Futuras.</b>	<b>83</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>85</b>
<b>8. Anexos Complementares</b> .....	<b>93</b>

## **1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

### **1.1) Matéria-prima e energia derivadas de petróleo: o desequilíbrio atual e a petroquímica verde**

O desenvolvimento industrial global atual tem uma íntima história com a exploração de matéria-prima não-renovável, no modelo de desenvolvimento socioeconômico atual – de fato, o petróleo como fonte energética e de matéria-prima para diversos produtos vem sendo utilizado desde 1900 (Randalls, 2010). Entretanto, estudos a partir de 1970 apontam que a utilização dos recursos carbônicos fixados na forma de petróleo em eras geológicas passadas traz impactos ambientais devido ao realocamento do carbono, seja na sua forma polimérica – os hidrocarbonetos que compõem o óleo, ou as cadeias fossilizadas do carvão mineral –, seja nas moléculas livres do gás natural, para as moléculas de monóxido e dióxido de carbono, além de outros poluentes, consequências de manipulações químicas derivadas do refino e sequencial combustão de determinados derivados. A isso se une o fato de que (a) as principais jazidas de petróleo estão localizadas em regiões de tensão geopolítica – as três crises do petróleo da história são reflexo da utilização do recurso natural como estratégia política de ataque, e de que (b) são recursos naturais não-renováveis. (ASPO, 2006). Atualmente, combustíveis fósseis (derivados de petróleo, carvão e gás natural) respondem por 86% da demanda global de energia, contra 8% de energia renovável e 6% da energia nuclear (EIA, 2006).

Apesar da inquestionável dependência dos processos globais em relação à matéria-prima fóssil, há tendência mundial de aumento de produtividade de combustíveis alternativos derivados de fontes renováveis, como o biodiesel e o bioetanol, sendo a utilização de recursos biológicos o foco dessa nova era na produção de energia (Galbe & Zacchi; 2002).

Em 2011, a produção de biocombustíveis foi dominada pelo etanol (84,6 bilhões de litros) e biodiesel derivado de fontes vegetais (19 bilhões de litros). Nesse cenário, os EUA são grandes produtores, com 52 bilhões de litros derivados da fermentação do milho, seguidos pelo etanol derivado da cana-de-açúcar do Brasil (21,1 bilhões de litros). É importante notar que esses números provêm do chamado etanol de primeira geração, e que previsões indicam que, futuramente, etanol será obtido através de outra estratégia: o chamado etanol de segunda geração, obtido através da fermentação de material lignocelulósico vegetal (NPC, 2012). Nesse contexto, o Brasil desponta como potência mundial, com dados coletados

possibilitando previsões de que em 2015 o país será responsável por 40% do comércio mundial de etanol (AIE, 2013).

Como descrito no item 1.5 a seguir, no promissor cenário da produção de biocombustíveis lignocelulósicos, microrganismos têm papel central nos processos de síntese, ao fermentar os substratos para a produção do etanol. Entretanto, não apenas os derivados energéticos do petróleo e gás natural necessitam ser substituídos – todo um rol de compostos derivados de fontes fósseis apresenta os mesmos impactos ambientais e complicações geopolíticas que os combustíveis fósseis carregam. Assim, a pesquisa para a obtenção de substitutos de derivados não-energéticos do petróleo apresenta tanta relevância quanto a pesquisa por biocombustíveis. Nesse contexto, microrganismos são capazes de produzir compostos hidrofóbicos – os chamados oleoquímicos –, tomando papel central nesse processo.

### **1.2) *Yarrowia lipolytica* como microrganismo de interesse industrial**

*Yarrowia lipolytica* é uma levedura hemiascomiceta não convencional, que habita ambientes ricos em compostos hidrofóbicos. Ela é classificada como levedura oleogênica, acumulando cerca de 40% de sua biomassa seca na forma de lipídeos (majoritariamente ácidos graxos), propriedade que é interessante para a produção de oleoquímicos (Barth & Gaillardin, 1996). A origem de sua utilização como micro-organismo de interesse se deu em 1950, com a produção de biomassa proteica para suplementação animal através do metabolismo de alcanos de descarte do fracionamento de petróleo (Ratledge); o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos e o crescimento do interesse econômico por metabólitos microbianos ofereceu nova perspectiva, e no momento este micro-organismo é encarado como ótima fonte para produção de ácidos succínico e cítrico e  $\alpha$ -cetoglutarato, utilizados como aditivos alimentares.

A capacidade de *Y. lipolytica* acumular altos níveis de ácidos graxos, seu crescimento em diversas fontes carbônicas, além da capacidade de ser domesticada e geneticamente manipulada (Abghari & Chen, 2014), colocaram tal levedura oleogênica novamente em foco como organismo de interesse.

Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas por diferentes grupos para o desenvolvimento de *Y. lipolytica* como plataforma biotecnológica para produção de lipídeos:

- Cultivo e fermentação: o estudo dos requerimentos fisiológicos da levedura são importantes para a otimização das condições de crescimento e acúmulo de compostos de interesse. Análises metabólicas comparativas definiram temperatura, pH, concentração de minerais e metais, porcentagem da relação carbono/nitrogênio, nível de oxigenação e a determinação do cultivo em batelada ou batelada alimentada como condições ideais para acúmulo de lipídeos. Atualmente, grupos estudam o melhor modo de extração de lipídeos a nível industrial e reciclagem da biomassa de levedura para reduzir custos de produção (Saha, 2003).
- Engenharia genética: pesquisadores introduziram genes específicos, tais como acetil- CoA sintase e ATP:citrato liase de *S. cerevisiae* e *Mus musculus*, para aumentar os níveis de acetil- CoA, e o aumento de gliceraldeído-3- fosfato através da superexpressão do gene *GPD1* (que codifica a enzima capaz de gerar aquele substrato) e do silenciamento do gene *GUT2* (que codifica enzima capaz de consumi- lo) ou ainda pelo silenciamento dos genes *TGL3* e *TGL4* (que codificam enzimas que consomem lipídeos), modificações estas que elevaram o conteúdo lipídico de *Yarrowia* (Saha, 2003).
- Prospecção de substratos: muitos grupos pesquisam o melhoramento do consumo de xilose por *Y. lipolytica*, seja por alterações nos níveis de expressão e regulação dos genes *XYL1* e *XYL2* nativos da levedura, seja por introdução dos mesmos genes vindos de outros organismos, seguido de análise de crescimento em hidrolisados de biomassa, com resultados variáveis (Saha, 2003).

### **1.3) Xilose e outros açúcares de cinco carbonos (C5) e seu consumo por *Y. lipolytica***

Um dos focos atuais no desenvolvimento biotecnológico de processos para geração de compostos renováveis é a conversão de material lignocelulósico oriundo de biomassa vegetal em produtos de interesse, através de engenharia metabólica de micro- organismos. As grandes quantidades de material lignocelulósico produzidas atualmente pela agroindústria, combinado a avanços na engenharia genética para sua utilização por diferentes microrganismos, colocam os açúcares derivados da hidrólise dessa biomassa como uma alternativa econômica de grande importância (Khlaassen et al., 2012).

O material lignocelulósico é formado por celulose, hemicelulose e lignina. Enquanto a celulose é um polímero de glicose, a hemicelulose é composta por D- xilose, D- glicose, D- manose, D- galactose e L- arabinose. Após tratamento químico- enzimático,

obtem-se altas quantidades de monômeros C6 (de 50% - 60% do total de monômeros originados na hidrólise) e C5 (de 25% - 30% do total de monômeros originados na hidrólise), que podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos por micro- organismos. Ao passo que a maioria dos organismos apresenta os mecanismos enzimáticos para consumo de glicose (C6), manipulações para o consumo de xilose (C5) são requisitos para que tais organismos sejam utilizados como plataforma industrial viável, pois tal pentose corresponde à segunda maior fração de açúcar recuperado após a hidrólise de biomassa lignocelulósica (Zhang & Wu, 2014, Krishnan et al., 2010, Papanikolau, 2010).

A maioria dos estudos metabólicos em *Yarrowia lipolytica* foi conduzida utilizando-se glicose como fonte de carbono. *Y. lipolytica* é capaz de acumular grande quantidade de lipídeos e de produzir compostos de interesse econômico caso o meio de cultura ofereça as condições necessárias: ela é capaz de atingir valores superiores a 40% de peso seco sob a forma de lipídeos em menos de 30h, em meio de crescimento composto por glicose, submetido a limitação de nitrogênio e a temperatura e pressão controladas (Zhang & Wu, 2014). Outras oleaginosas acumulam valores similares de lipídeos – *Candida albidus* com 46%, *Rhodotorula toluroides* com 48%, *Rhodotorula glutinis* com 40% e *Crptococcus curvatus* com 33% - ou até superiores, como *Lipomyces starkeyi* com 61,5%, *Rhodotorula gracilis* com 68% e *Rhodospiridium toruloides* com 76%, mas com diferenças fisiológicas substanciais entre si, com destaque para o crescimento melhor de *Yarrowia* em substrato lignocelulósico quando comparada com esses outros microrganismos, como consequência de sua diversa maquinaria genética e bioquímica para consumo de diversas fontes carbônicas.

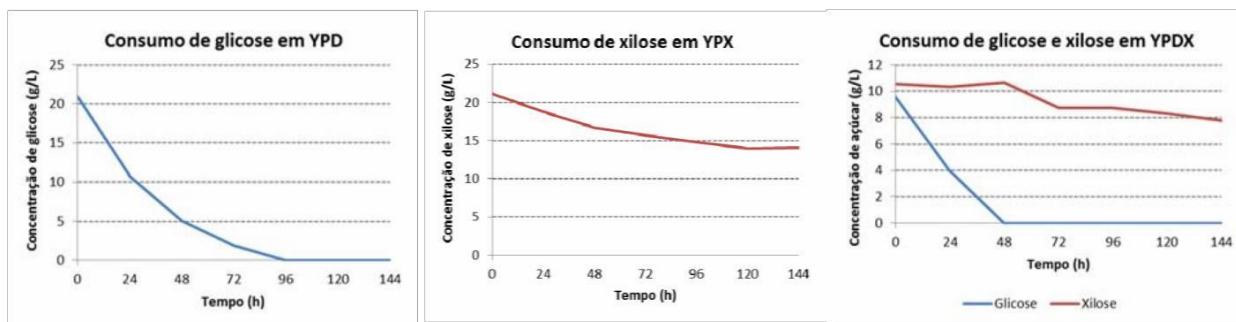
Yu e colaboradores estudaram o crescimento de *Y. lipolytica* e outras leveduras oleogênicas em hidrolisado de palha de aveia (Tabela 1). Observou-se que a síntese de compostos hidrofóbicos por *Y. lipolytica* não é tão elevada, inferior ao obtido por outros grupos em meios de cultura definidos (nas mesmas condições de rotação e temperatura). Tsigie et. al. também estudou o crescimento de *Y. lipolytica* em hidrolisado de palha de arroz, obtendo como resultado máximo um total de 21,66% de acúmulo de peso seco em lipídeos após 96h de crescimento, considerado um “pobre desempenho” segundo o próprio grupo de pesquisa. Como indicado pelos mesmos autores, *Y. lipolytica* é a oleagínosa mais utilizada em laboratório por ser a única levedura do grupo que apresenta sucessos em procedimentos de manipulação genética, apresentar requerimentos nutricionais pouco complexos e ser aquela com características que facilitem sua futura domesticação como levedura industrial.

Em concordância com os dados da literatura, dados de nosso grupo para o crescimento de *Y. lipolytica* em xilose como fonte única de carbono mostram que a levedura é capaz de crescer consumindo a pentose, mas com habilidade e rendimento muito inferiores ao crescimento em meio contendo glicose como fonte de carbono majoritária, conforme evidenciado na Tabela 2. Nesse trabalho prévio, células de *Y. lipolytica* foram submetidas a duas condições de crescimento, com variação na concentração de nitrogênio no meio de cultura: os meios YPD e YPX continham, respectivamente, glicose (D) e xilose (X), apresentando também nitrogênio, enquanto que os meios YPD- N e YPX-N possuíam as mesmas quantidades de glicose e xilose, mas concentrações de nitrogênio 100 vezes inferior àquelas encontradas nos meios YPD e YPX correspondentes. Dados de consumo dos açúcares foram medidos por cromatografia HPLC (Figura 1), e as porcentagens de massa de lipídeos foram obtidas da relação do peso da extração de lipídeos pelo total de massa celular seca (Tabela 2). Torna-se evidente de tais dados a necessidade do melhoramento das vias de metabolismo e consumo de xilose para *Y. lipolytica*.

**Tabela 1:** Dados de peso seco das células (DCW) e acúmulo de lipídeos em hidrolisado de palha de aveia por *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus curvatus*, *Rodothorula glutinis*, *Rodothorula toruloides* e *Lipomyces starkeyi*, todos modelos de estudo de acúmulo de lipídeos, em hidrolisado sem descontaminação de inibidores (NDLH) e descontaminado (DLH), mantido a 28°C e 200rpm. Yu et. al.

Espécie	Peso seco das células (DCW), g/L		Conteúdo lipídico (%)		Concentração de lipídeos no meio (g/L)	
	NDLH	DLH	NDLH	DLH	NDLH	DLH
<i>Y. lipolytica</i>	7,8 ± 0,7	7,2 ± 0,2	4,6 ± 0,0	4,4 ± 0,3	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
<i>Candida. curvatus</i>	17,2 ± 0,4	15,6 ± 0,0	33,5 ± 0,1	27,1 ± 0,6	5,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1
<i>Rhodotorula. glutinis</i>	13,8 ± 0,3	11,8 ± 0,3	25,0 ± 0,6	20,7 ± 0,9	3,5 ± 0,0	2,4 ± 0,2
<i>R. toruloides</i>	N/D	9,9 ± 0,0	N/D	24,6 ± 0,7	N/A	2,4 ± 0,1
<i>Lipomyces starkeyi</i>	14,7 ± 0,5	12,7 ± 0,2	31,2 ± 1,3	29,1 ± 0,5	4,6 ± 0,0	3,7 ± 0,0





**Figura 1:** Gráficos de consumo de glicose e xilose por *Y. lipolytica*. Enquanto que 20g de glicose são totalmente consumidos em 96h, o consumo de xilose não ultrapassa 6g. Caso a levedura cresça em meio de glicose + xilose (simulação de hidrolisado de biomassa), a glicose é o açúcar preferencialmente consumido, mas há dificuldades no consumo de xilose mesmo após a exaustão da hexose

**Tabela 2:** Dados de nosso grupo de pesquisa para o crescimento de *Y. lipolytica* em meio com glicose, seja com abundância de nitrogênio ou com restrição de nitrogênio (YPD e YPD-N, respectivamente) e em xilose com nitrogênio e com restrição de nitrogênio (YPX e YPX-N), evidenciando o menor crescimento em biomassa e em acúmulo de lipídeos quando em contato com xilose como única fonte de carbono

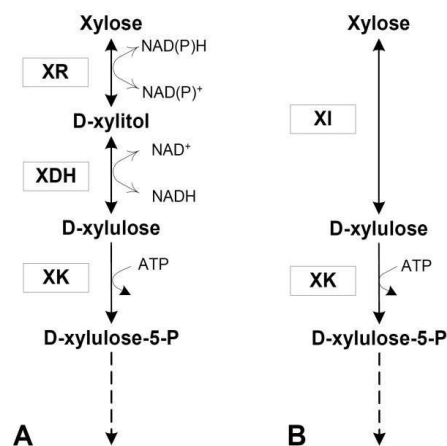
Condições de crescimento		OD <sub>600</sub> final	Peso seco (mg)	Lipídeos (mg)	% lipídeos
Meio	Tempo				
YPD	24h	8,90 ± 0,41	167,9 ± 6,0	16,6 ± 1,3	9,7% ± 0,6%
	96h	13,88 ± 0,80	273,0 ± 21,7	22,7 ± 0,9	8,4% ± 0,7%
YPD-N	24h	10,64 ± 0,50	115,3 ± 14,6	28,5 ± 1,7	25,1% ± 2,5%
	96h	16,63 ± 0,05	181,9 ± 3,4	55,6 ± 3,0	30,6% ± 1,8%
YPX	24h	4,97 ± 0,29	51,0 ± 3,9	7,8 ± 3,4	12,1% ± 6,5%
	96h	13,76 ± 0,24	175,3 ± 5,1	18,3 ± 0,6	10,5% ± 0,1%
YPX-N	24h	3,03 ± 0,07	33,8 ± 2,1	9,8 ± 0,6	28,9% ± 1,6%
	96h	2,71 ± 0,04	32,6 ± 2,1	11,0 ± 2,8	34,2% ± 10,0%

#### 1.4) Vias de consumo de xilose

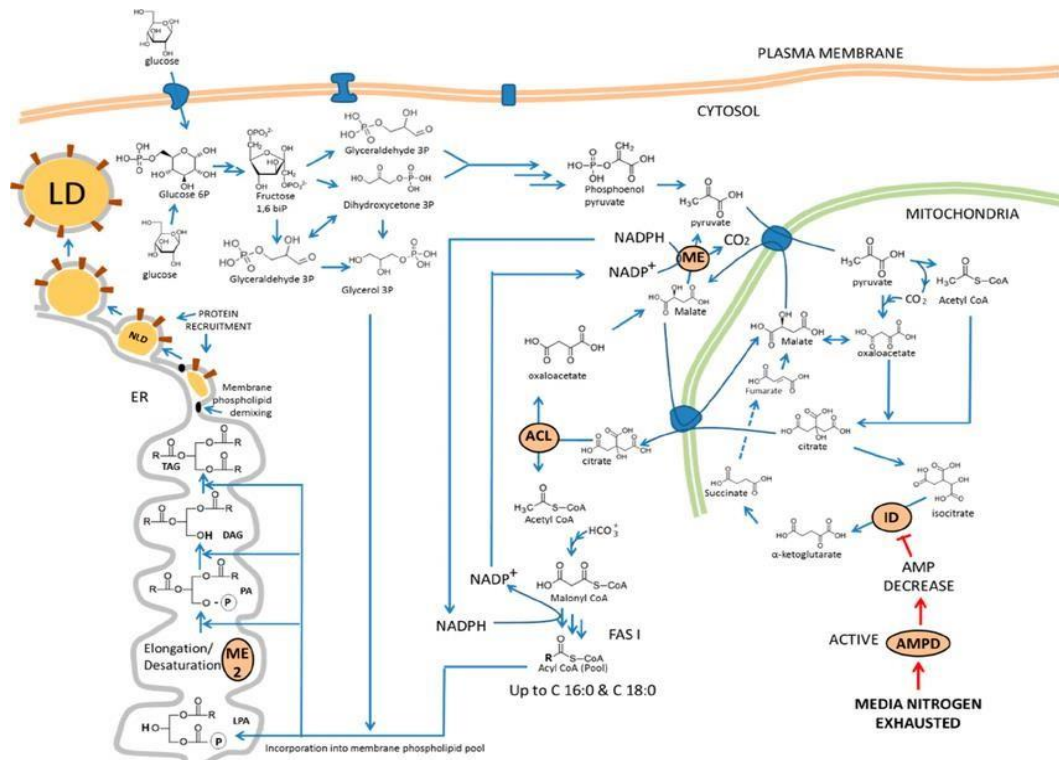
Diversos microrganismos são capazes de fermentar pentoses e hexoses, incluindo bactérias e leveduras. As bactérias *Zymomona mobilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* são amplamente utilizadas para tal fim, mas todas com pouca eficiência (Doran et al., 2000, Hahn-Hägerdal et al., 1994). Entre as leveduras, destacam-se as espécies *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, além de *S. cerevisiae* submetida a engenharia genética das vias de consumo de xilose (Hahn-Hägerdal et al., 2001).

Há duas vias de consumo de xilose utilizadas em estudos de manipulação genética em micro- organismos, uma ocorrendo em bactérias e outra em leveduras e fungos filamentosos. Na primeira via, a xilose é isomerizada diretamente a xilulose, pela xilose isomerase; na segunda, a xilose é reduzida a xilitol pela xilose redutase; a seguir, o xilitol é oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (van Hoek, van Dijken & Pronk, 2000). Entretanto, a xilulose não pode ser utilizada diretamente como substrato metabólico em micro- organismos modificados, sendo necessária a superexpressão de xiluloquinases, enzimas que fosforilam xilulose a xilulose- 5- fosfato, disponibilizando assim essa fonte de carbono para a via das pentoses- fosfato (Figura 2) (Zhou, 2011).

A via das pentoses permite que a xilose se integre às vias de fermentação, pois é a única via conhecida para a metabolização de pentoses, onde xilulose 5-fosfato é convertido a gliceraldeído- 3- fosfato; o gliceraldeído- 3- fosfato é então direcionado para diferentes vias, como o ciclo de Krebs, a fermentação alcoólica e a lipogênese (Karhumaa, 2007).



**Figura 2:** Vias metabólicas para utilização de xilose em microorganismos. A via bioquímica da esquerda refere-se ao mecanismo utilizado por fungos, a chamada via oxi-redutiva, enquanto a via da direita representa a via da xilose isomerase de bactérias. Ao final de ambas, é necessária a modificação da xilulose para xilulose-5-fosfato para sua integração ao metabolismo dos microorganismos. XR: xilose redutase; XDH: xilitol desidrogenase; XI: xilose isomerase; XK: xiluloquinase. Adaptado de Karhumaa et al., 2007.



**Figura 3:** Vias metabólicas de síntese de lipídeos em *Yarrowia lipolytica*. Após a conversão de xilulose em xilulose-5-fosfato ela é integrada à via das pentoses fosfato e transformada em gliceraldeído 3-fosfato, que é integrado então na glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos, na mitocôndria. Com a depleção de nitrogênio no meio o ciclo dos ácidos tricarboxílicos é interrompido e o carbono que ali seria metabolizado é desviado para a produção de lipídeos no retículo endoplasmático rugoso, sofrendo diversas modificações.

### 1.5) Modificações genéticas para o consumo de xilose em leveduras

Atualmente, são utilizadas bactérias e leveduras para os procedimentos de engenharia genética para o consumo de xilose, com foco na fermentação alcoólica. As leveduras são preferidas por apresentarem melhores respostas às condições industriais, como crescimento ótimo em pH ácido, por serem nutricionalmente pouco exigentes, mais resistentes a contaminações e a inibidores (Zaldivar, Nielsen & Olsson, 2001). Dentre as leveduras, *S. cerevisiae* é a mais utilizada, pois foi amplamente estudada e modificada para desenvolver adaptações às condições de fermentação industrial; entretanto, sua incapacidade de consumir pentoses levou a modificações metabólicas para que passasse a consumir xilose. *S. cerevisiae* apresenta a maquinaria necessária para converter xilulose a gliceraldeído-3- fosfato; assim sendo, a introdução de vias de metabolismo de xilose a xilulose através da expressão dos genes dessa rota bioquímica é a principal estratégia utilizada (Tomás-Pejó, Oliva & Ballesteros, 2008, Amore, Wilhelm & Hollenberg, 1989). Ambas as vias de conversão de xilose a xilulose foram inseridas em *S. cerevisiae*. Embora muitos genes de xilose isomerase tenham sido reconhecidos em diversas bactérias, poucos são aqueles que apresentam

expressão bem-sucedida em *S. cerevisiae* (sempre em taxas sub-ótimas). Uma alternativa empregada com sucesso foi a otimização dos códons dos genes provenientes de procariotos. Brat *et. al* otimizaram o gene da xilose isomerase de *Clostridium phytofermentans*, obtendo aumento de 46% no crescimento de *S. cerevisiae* em xilose, quando comparado com a transformação com o gene nativo original (Wiedemann & Boles, 2008, Brat, Boles & Wiedemann, 2009, Karhumaa et al, 2007). Estudos de expressão heteróloga dos genes de xilose redutase e xilitol desidrogenase em *S. cerevisiae* têm focado nos genes *XYL1* e *XYL2* de *Scheffersomyces stipitis* (Matsushika & Sawayama, 2011, Fantanille et al., 2012).

A disponibilização de xilose como açúcar assimilável aumenta os níveis de carbono assimilável no meio de hidrolisado lignocelulósico, enquanto mantém os níveis de nitrogênio constantes. Resultados da literatura entram em confluência com os do nosso grupo de pesquisa (Tabela 2) quando afirmam que uma maior razão carbono assimilável/nitrogênio no meio é fator influente para maior acúmulo de lipídeos em diferentes espécies, descrito em 1.1; assim, espera-se que leveduras capazes de consumir xilose além de glicose em um mesmo meio acumulem óleos (Greer et al., 2015). Se por um lado *S. cerevisiae* reflete a fisiologia de acúmulo de lipídeos descrita e é uma plataforma promissora para o consumo de xilose, por outro lado não acumula lipídeos eficientemente, atingindo níveis de 6% – 7% de massa seca na forma de lipídeos mesmo quando condicionada fisiologicamente ou modificada geneticamente (Kolouchová et al., 2015, Beopoulos et al., 2009).

Como descrito anteriormente, *Y. lipolytica* é o modelo para estudo de leveduras oleogênicas, uma vez que acumula altos níveis de lipídeos, tem via lipogênica bem descrita, e é passível de manipulação genética; de fato, procedimentos genéticos realizados com *S. cerevisiae* podem ser reproduzidos em *Yarrowia*, através do emprego de protocolos de transformação específicos, tornando-a ideal para ser manipulada visando à criação de uma plataforma biotecnológica consumidora de xilose que produz altos níveis de oleoquímicos. **Nesse projeto, objetivou-se o desenvolvimento de uma linhagem de *Yarrowia lipolytica* através de transformação genética com genes de xilose isomerase, buscando obter uma maior produção de óleos a partir de xilose.**

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver uma variedade de *Yarrowia lipolytica* capaz de produzir altos níveis de lipídeos enquanto consome xilose de maneira eficiente, através de expressão heteróloga do gene da xilose isomerase. Objetivou-se obter uma levedura com potencial para uso como plataforma de fermentação industrial para a produção de oleoquímicos de interesse econômico, a partir de biomassa lignocelulósica.

Os seguintes objetivos específicos foram perseguidos:

- Seleção e amplificação do gene xilose isomerase de *Piromyces*;
- Otimização dos codons da sequência desse gene para se tornarem ideais para o codon usado de *Y. lipolytica*;
- Clonagem do gene- alvo em vetore de expressão específico para *Yarrowia lipolytica*;
- Transformação de leveduras *Y. lipolytica* com as construções de DNA e comparação dos fenótipos dos microrganismos nativa e transformado por meio de curvas de crescimento em meios de cultura específicos e análise de HPLC para avaliar o consumo de xilose;
- Análise do fenótipo transformante resultante e caracterização da linhagem transformada, tanto nos níveis de consumo de xilose e glicose quanto nos índices de acúmulo de lipídeos e seu crescimento em meios com proporções distintas de glicose e xilose.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Material biológico

A linhagem de *Yarrowia lipolytica* utilizada ao longo do trabalho é identificada como Po1g, cuja identificação genotípica distinta de outras linhagens é MatA, leu2-270, ura3-302::URA3, xpr2-332, axp-2, responsável por gerar o fenótipo de auxotrofia ao aminoácido leucina – o que opera como o marcador de seleção dos transformantes gerados a partir dela. Essa linhagem foi escolhida por ser simultaneamente capaz de consumir um nível menor de xilose – facilitando as análises de nativa x transformante – enquanto suas modificações permitem a inserção de genes em seu genoma e a seleção dos transformantes após crescimento em meio auxotrófico para leucina.

#### 3.2) Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados ao longo do trabalho estão descritos a seguir:

**LB:** 1% de triptona/peptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 2% de ágar, caso o meio seja sólido (em massas: 10 g/L de triptona/peptona, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl e 20 g/L de ágar). Nas etapas para as quais se objetivava a seleção de transformantes, se adicionou ao meio 80 µg/mL de X-Gal e/ou 100 µg/mL de ampicilina. Esse foi o meio de cultura padrão utilizado para o crescimento de bactérias.

**YP:** 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% fonte de carbono, 2% ágar, caso o meio seja sólido (em massas: 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de fonte de carbono, 20 g/L de ágar). Meio padrão utilizado para o cultivo de leveduras, incluindo *Y. lipolytica*. A partir desse protocolo as proporções dos compostos que atuaram como fonte de carbono foram modificadas, originando os meios YPD (2%/20 g/L de dextrose), YPX (2%/20 g/L de xilose), YPDX 1,5% (1,5%/15 g/L de dextrose e 0,5%/5 g/L de xilose) e YPDX 0,5% (0,5%/5 g/L de dextrose e 1,5%/15 g/L de xilose).

**YNB:** 1,67% YNB sem aminoácidos (Difco), 5% de nitrato de amônio, 2% fonte de carbono de interesse (dextrose), 1% solução *dropout* Sigma cód. 2001-20G (mistura com concentrações conhecidas aminoácidos e nucleotídeos, exceto aquele que irá atuar como a marca de seleção) e 2% ágar, caso o meio seja sólido (em massas: 1,67 g/L de YNB Difco, 5 g/L de nitrato de amônio, 20 g/L de dextrose, 10 g/L de solução dropout Sigma com uracila, histidina e triptofano, 20 g/L de ágar). Modificação do meio YP para leveduras com o objetivo de selecionar as células derivadas da linhagem auxotrófica original das que

incorporaram e transformaram o cassete de expressão contendo a marca de seleção. No trabalho, a seleção atuou a separar os auxotróficos para o aminoácido leucina dos mutantes com o gene LEU2 inserido em seu genoma, junto com o gene de interesse no cassete de expressão (portanto não mais auxotróficos).

**YnP:** 0,01% extrato de levedura, 0,02% peptona, 2% fonte de carbono (em massas: 0,1 g/L de extrato de levedura, 0,2 g/L de peptona, 20 g/L de fonte de carbono). Modificação do meio padrão utilizado para o cultivo de leveduras, incluindo *Y. lipolytica*, direcionado para o acúmulo lipídico. A partir desse protocolo as proporções dos compostos que atuaram como fonte de carbono foram modificadas, originando os meios YnPD (2%/20 g/L de dextrose), YnPX (2%/20 g/L de xilose), YnPDX 1,5% (1,5%/15 g/L de dextrose e 0,5%/5 g/L de xilose) e YnPDX 0,5% (0,5%/5 g/L de dextrose e 1,5%/15 g/L de xilose).

### 3.3) Condições de cultivo

As linhagens de *E. coli*, com plasmídeo ou não, foram cultivadas a 37°C sem agitação (no caso de placas de cultura) ou com agitação a 250 rpm (no caso de inóculos), sendo 16 – 17h de cultivo o suficiente para a saturação do meio com as bactérias (“*overnight*”). As linhagens de *Y. lipolytica* foram cultivadas a 28°C sem agitação (no caso de placas de cultura) ou com agitação a 250 rpm (no caso de inóculos), sendo necessário de quatro a sete dias de crescimento para o surgimento e expansão das colônias.

### 3.4) Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados para o desenvolvimento do trabalho estão a seguir:

**pYLEX1:** vetor circular obtido comercialmente (Yeastern Biotech Co.), específico para manipulações genéticas em *Y. lipolytica* linhagem Po1g, especial para induzir a síntese de proteínas citosólicas não-glicosiladas. Apresenta a região de clonagem múltipla com os sítios de restrição para *PmlI*, *BamHI*, *XcmI* e *KpnI* (citados na sequência do promotor ao terminador da região), os sítios para linearização visando recombinação homóloga com a região pBR do genoma da Po1g (na ordem, *Esp3I*, *SpeI*, *SfiI*, *NotI* e *SacII*), gene de resistência a ampicilina para a seleção bacteriana e o gene LEU2 para compensar a auxotrofia após a transformação e recombinação com linhagens Po1g auxotróficas a leucina. Utilizado para expressão heteróloga do gene da xilose isomerase (*xylA*) de *Pyromices* E2 em *Y. lipolytica* Po1g.

**pGem-T-easy:** vetor linear obtido comercialmente (Promega), apresenta timinas em ambas as extremidades para facilitar a clonagem de produtos de PCR que possuam adenina na região 3', a qual pode ser naturalmente adicionada por uma polimerase comum (GoTaq), ou então adicionada por uma reação de adenilação após a amplificação do fragmento por uma polimerase *high fidelity*. Apresenta gene de resistência a ampicilina e a região de clonagem múltipla inserido no gene lacZ, que permite a seleção de bactérias *E. coli* que tanto apresentem o plasmídeo absorvido pela célula quanto o gene inserido no plasmídeo, se sujeito às condições de antibiótico no meio e presença de X-Gal na placa de cultura. Plasmídeo utilizado para manter cópias do gene *xylA* em culturas permanentes, para o sequenciamento do mesmo gene em sequenciador, e posterior sobclonagem do gene xilose isomerase para passos seguintes do trabalho.

### 3.5) Extração do DNA genômico de *Y. lipolytica*

Para a extração de DNA genômico de *Y. lipolytica* primeiramente foi preparado um inóculo em 50 mL de meio YPD para crescimento sob 28°C, 250 rpm, por 24h, para que se atinja o mais perto possível da fase exponencial. Com o crescimento adequado, separou-se alíquotas de 1,5 mL que foram centrifugadas continuamente no mesmo tubo, até que o volume do precipitado se aproximasse de 100 µL. A seguir esse precipitado foi ressuspenso em 200 µL de tampão de lise celular (solução de 20% de Triton X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA), 200 µL de solução fenol equilibrado + clorofórmio + álcool isoamílico (proporção 25-24-1, respectivamente) e um volume de aproximadamente 200 µL de glass beads 0,5 mm, sendo essa mistura submetida a agitação intensa por dois minutos para garantir o rompimento celular com seguinte degradação de compostos orgânicos celulares exceto o DNA cromossomal. Após centrifugação a 14.000 rpm a 21°C por 15 minutos, a fase aquosa foi separada, por ser ali onde o DNA cromossomal se encontrava; essa fase aquosa foi lavada com 300 µL de clorofórmio, sendo centrifugada a 14.000 rpm, a 21°C por 15 minutos após agitação intensa. Novamente, a suspensão líquida foi recolhida a novo tubo, no qual foi adicionado uma relação 1/10 do volume total obtido de acetato de sódio 3M e duas vezes esse mesmo volume de etanol absoluto. Essa nova solução foi mantida a -20°C ao longo de uma hora, sendo precipitada em rotação na centrífuga a 14.000 rpm, 4°C por dez minutos. O precipitado sólido foi lavado com 200 µL de etanol 70%, sendo centrifugado uma última vez a 14.000 rpm, 4°C, por cinco minutos e, por fim, seco e ressuspenso em 20 µL de Tris/EDTA + 1 de µL RNase.



### 3.6) Extração de RNA total de *Y. lipolytica*

A extração de RNA total de *Y. lipolytica* foi feita segundo um protocolo de extração de NA total do fungo vassoura-de-bruxa, desenvolvido no Laboratório de Genômica e Expressão da Universidade Estadual de Campinas. Para ele, primeiro foi feito um pré-inóculo em 50 mL de YPD, crescido *overnight*. A partir desse pré-inóculo um inóculo definitivo em 10 mL de YPD foi feito, calculando-se a OD inicial de 0,3 e, após crescimento de 6 – 10h, centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 minuto repetidamente até que o volume das células fosse próximo de 400 µL. Nesse precipitado adicionou-se 400 µL de glass beads de 0,5 mm junto com 500 µL de tampão de extração (solução de 150 mM de NaAc pH 5,5, 50 mM de EDTA, 0,5% de SDS, 100 mM de NaCl e 2% de β-mercaptoetanol, diluídos em água DEPC) e 400 µL de fenol ácido. Após agitação intensa por três minutos (para lisar as células e degradar todo o material orgânico, em especial RNases, com exceção do RNA). A seguir, adicionou-se mais 300 µL de tampão de extração e 200 µL de clorofórmio e, após homogeneização, a suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm, 4°C, por dez minutos. A fase aquosa resultante foi separada a outro tubo, onde se adicionou 500 µL de fenol ácido e 200 µL de clorofórmio. Após outra homogeneização, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm, 4°C, por dez minutos, e o sobrenadante resultante foi transferido a novo tubo. Nesse sobrenadante foi adicionado 500 µL de clorofórmio e, após uma terceira homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, 4°C, por 30 minutos, e esse novo sobrenadante obtido foi transferido a novo tubo, no qual adicionou-se 1 mL de isopropanol 100%. Essa solução alcoólica foi mantida a -20°C por uma hora, para a seguir ser centrifugada a 14.000 rpm, 4°C por 30 minutos, e após essa etapa o sobrenadante foi descartado. O precipitado obtido, contendo o RNA de interesse, foi lavado com 500 µL de etanol 70%, e esse sobrenadante etanólico foi descartado após centrifugação da amostra a 14.000 rpm, 4°C, por dez minutos e, após secagem adequada sob vácuo, foi dissolvido em 100 µL de água DEPC.

### 3.7) Síntese de cDNA a partir do RNA extraído

A construção do cDNA a partir do RNA total extraído foi feita com a enzima *Superscript II* e Kit de síntese de cDNA da *Invitrogen*. A reação nele, dividida em três etapas, se baseia em um tratamento inicial com DNases e a sua seguinte inativação, evitando contaminações de eventual material genômico (primeira etapa), adição dos chamados *Random primers* (os oligonucleotídeos, a segunda etapa), e a síntese de cDNA em si, com inibidor de RNases (terceira etapa). Esse procedimento foi feito para confirmar a expressão do gene *xylA* em *Y. lipolytica*, usando como controle positivo uma amplificação de *xylA* a partir do

plasmídeo que a empresa nos enviou o gene sintetizado, e como controle negativo uma linhagem Po1g de *Yarrowia* não transformada.

### **3.8) Extração de DNA plasmidial em mini escala (miniprep)**

Para a extração de DNA plasmidial de bactérias as colônias que apresentavam os marcadores de interesse eram separadas das placas e inoculadas em meio LB contendo ampicilina, a 100 µg/mL, e mantidas em shaker aquecido a 37°C com rotação de 250 rpm, *overnight*. As células foram centrifugadas a 14.000 rpm por um minuto e no precipitado formado foi adicionado a P1 (solução contendo 10 mM de EDTA pH8, 25 mM de Tris-HCl pH8 e 1 mL de RNase). Após agitação vigorosa, era adicionado P2 e P3 em sequência (uma solução contendo 0,2% de NaOH e 1% de SDS, e outra contendo 3M de acetato de potássio e 11,5% de ácido acético glacial, respectivamente), para a seguir serem incubadas por 20 minutos no gelo. Após esse período de resfriamento, as amostras eram centrifugadas a 14.000 rpm, 4°C, por 15 minutos, e o sobrenadante era coletado a outro tubo, no qual se adicionava 1 mL de isopropanol 100% resfriado a 0°C. após a homogeneização essa solução alcoólica era submetida a centrifugação a 14.000 rpm, 4°C, por dez minutos, e o precipitado obtido era lavado com 700 µL de etanol 70% gelado. A última centrifugação era então conduzida, a 14.000 rpm, 4°C, por cinco minutos, e o precipitado obtido era devidamente seco e ressuspensão em 20 µL de água MiliQ.

### **3.9) Preparação de bactérias eletrocompetentes**

O protocolo para preparação de células eletrocompetentes foi retirado de Sambrook & Russel (2001). Um pré-inóculo de *E. coli* DH5α foi feito em 100 mL de meio LB, para crescimento *overnight* a 37°C e 250 rpm. No dia seguinte, foi calculado uma diluição a partir da OD alcançada de modo que o inóculo definitivo em um litro de meio LB alcançasse OD 0,1; a seguir, o crescimento celular do inóculo foi acompanhado até que a OD chegasse a 0,6. Depois desse ponto, a cultura foi separada em frascos de 250 mL, com seu crescimento sendo paralisado ao serem mantidas em gelo por 30 minutos. Essa cultura resfriada foi centrifugada a 4.000 G, a 4°C, por 15 minutos, e o meio sobrenadante foi removido para iniciar as lavagens com glicerol 10% gelado. Em um total de três lavagens seguidas foi usado dois litros de glicerol 10% resfriado a 4°C, com centrifugações sequenciais a 4.000 G, 4°C e 15 minutos entre cada lavagem e descarte de sobrenadante. Na lavagem final os precipitados resultantes foram suspensos em 4 mL de glicerol 10% gelado, e essa suspensão *E. coli* em glicerol foi aliquoteado em 40 µL por tubo, para ser congelados

instantaneamente em nitrogênio líquido logo a seguir. O resultante é aproximadamente 100 tubos de células eletrocompetentes, que foram usadas ao longo de todo o trabalho.

### **3.10) Transformação de *E. coli* (eletroporação)**

Para cada transformação uma determinada quantidade de DNA plasmidial foi aliquotada em um dos tubos com bactérias eletrocompetentes e essa mistura era transferida para cubetas de eletroporação 0,2 cm (BioRad), sendo aplicada nela uma corrente elétrica de voltagem 2,5 kV em eletroporador *E. coli Pulser* (BioRad). Imediatamente a seguir as bactérias eram ressuspensas em 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C, por 60 minutos, para depois serem plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina a 100 µg/mL.

### **3.11) Transformação de *Y. lipolytica* (kit YLEX)**

A transformação da linhagem Po1g da *Yarrowia* foi conduzida inicialmente segundo as recomendações do kit de transformação e expressão YLEX (Yeastern Biotech Co.), especializada para manipulações dessa espécie de levedura. No protocolo ordena-se que uma colônia de *Yarrowia lipolytica* Po1g seja inoculada em 10 mL de YPD pH 4, e seja crescida até o momento de saturação (20 a 22h) a 250 rpm. Após sua precipitação em rotação em centrífuga, deve-se lavar as células com água miliQ duas vezes, e ressuspender o precipitado em 1 mL de acetato de lítio pH 6, do qual se separa 100 µL dessa quantia de células para a transformação em si. Para cada alíquota de 100 µL adiciona-se o *YLOS cocktail* (solução contendo 95 µL de tampão YLOS, 5 µL de solução DTT a 0,35 g/mL, 2,5 µL de DNA carreador e de 5 a 100 ng de vetor de expressão linearizado na região pBR, com os três primeiros itens vindos no kit). A seguir, se incuba os tubos com a mistura células + tampão de transformação a 39°C por 60 minutos, plaqueando logo a seguir a transformação em meio YNB com dextrose e esperando o crescimento, que pode demorar até quatro dias para acontecer. Entretanto, algumas condições tiveram que ser adaptadas, a saber: tempo e temperatura para o choque térmico da transformação (80 minutos, a 40°C), tempo de centrifugação durante as lavagens (8 minutos, a 10.000 rpm), concentração final de acetato de lítio (100 mM) e massa de cassete de expressão linearizado (100 ng).

### **3.12) Oligonucleotídeos iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados durante o trabalho foram desenhados manualmente levando em consideração os seguintes parâmetros: tamanho da sequência (variando de 18 a 25 pares de base), conteúdo GC (se mantendo em torno de 40 a 50%,

enquanto se mantinha a especificidade da reação) ,a complementariedade da sequência (de modo que os oligos formados nem se anelassem entre si, o chamado *cross dimer*, a complementariedade intermolecular, e tampouco se anelassem neles mesmos, formando o chamado *self dimer*, ou complementariedade intramolecular) e a temperatura de *melting* (evitando que as T<sub>m</sub> diferissem muito entre si e nem que fossem muito elevadas. Para analisar os parâmetros acima, o software online *Beacon Designer Free Edition* foi utilizado. A **Tabela 3a** seguir apresenta todos os oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do trabalho, sua sequência e a sua aplicação.

**Tabela 3:** Lista de oligonucleotídeos iniciadores, suas respectivas sequências de nucleotídeos e sua utilização no desenvolvimento do trabalho.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Utilização
XylA_for_Bam	5'ATCGGATCCATGGCTAAGGAGTACTTTC CCCAG3'	Amplificação do gene <i>XylA</i> e criação de sítios de restrição para sua inserção no vetor pYLEX
XylA_rev_Kpn	5'ATCGGTACCTTACTGGTACATAGCGACA ATGGCCTCG3'	
M13_F_-47	5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'	Primers usados na etapa de sequenciamento para conferir se o gene <i>XylA</i> comprado tinha mutações
M13_R_-48	5'AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA3'	

### 3.13) Construção do cassete pYLEX + *XylA*

Para a construção do cassete foram abordados dois métodos distintos: a reação de Gibson (*Gibson Assembly*) e uma estratégia utilizando digestões e ligações em sítios específicos. Isso aconteceu devido às dificuldades encontradas na operação do método de Gibson. Ambas as estratégias abordadas estão descritas a seguir.

O vetor de expressão utilizado para a construção do cassete foi o pYLEX, o qual veio junto com o kit YLEX de transformação e expressão da Yeastern Biotech Co. O vetor pYLEX é derivado do plasmídeo pINA1269, e carrega um forte promotor constitutivo híbrido (hp4d), com quatro cópias de uma sequência ativadora a *upstream* (ativador UAS1B) logo anteriormente à região de clonagem múltipla. Essa região de clonagem múltipla apresenta os sítios a seguir, na ordem: *PmlI*, *BamHI*, *XcmI* e *KpnI*. Devido à necessidade de se manter o gene *XylA* no sentido promotor -> terminador para que ele fosse expresso corretamente, a

ordem da inserção tem grande relevância e, com base nos estoques de enzima do laboratório, os sítios escolhidos foram *BamHI* a *upstream* e *KpnI* a *downstream*. Disso derivou a estratégia inicial de clonagem: amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, como descrito em Sambrook & Russel, 2001, com a enzima polimerase de alta fidelidade *Phusion*, da *Invitrogen*) usando os primers *BamHI\_for\_XylA* e *KpnI\_rev\_XylA* para inserir os sítios desejados. Essa amplificação foi adenilada segundo reação recomendada pelo protocolo da enzima *Phusion*, para ser ligada através de uma reação de ligação com a enzima DNA Ligase (*Promega*) com o vetor pGEM-T-Easy, já descrito, para garantir a manutenção do gene com os sítios de restrição de interesse.

Foi então conduzida a digestão dupla usando as enzimas *BamHI* e *KpnI*, com o tampão *BamHI* 10x, todos da *Promega* (com o dobro de enzima *KpnI*, por ela não atuar em condições ótimas devido ao tampão não-específico), tanto da ligação *BamHI-XylA-KpnI*+pGEM quanto do vetor pYLEX. Ambas as reações foram purificadas usando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* da *Promega*, para a seguir serem ligadas uma com a outra usando a enzima DNA Ligase da *Promega*, seguindo as recomendações do protocolo do reagente.

A reação de Gibson (2009) é uma reação de junção de fragmentos que se baseia na sobreposição de extremidades idênticas entre si de fragmentos distintos, seguida por uma reação de degradação das extremidades 5' com a enzima T5 exonuclease, o que provoca o anelamento das simples fitas 3' formadas e seguinte amplificação do restante da fita simples através de uma polimerase de alta fidelidade e ligação das quebras de fita simples resultantes com uma enzima DNA Ligase. Na situação do trabalho, as extremidades idênticas eram os sítios de restrição *BamHI* e *KpnI*, gerados no gene através de amplificação por PCR, e naturais do vetor pYLEX. A reação em questão foi feita algumas vezes, mas não foi obtido sucesso em nenhuma delas.

### **3.14) Amplificações através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

As reações de PCR foram feitas com os primers já descritos. Quando da amplificação do gene *XylA*, sempre optou-se por usar a enzima de alta fidelidade *Phusion*, da empresa *Invitrogen*, usando a dita enzima, os primers *BamHI\_for\_XylA* e *KpnI\_rev\_XylA*, o tampão específico da enzima, dNTPs, DMSO e o DNA a ser replicado, seja o gene *XylA* ligado no vetor pUC57 (como veio da empresa da qual o gene sintético foi comprado), seja o

gene *XylA* ligado ao pGEM após a primeira etapa de manipulação do material genético descrita acima. As condições ótimas de reação identificadas foram 30 segundos a 98°C, 10 segundos a 98°C – 30 segundos a 52°C – 22 segundos a 72°C (com 35 ciclos para essas três etapas), 7 minutos a 72°C e terminando a 4°C por tempo indeterminado.

Também foi feita reação de PCR usando a enzima GoTaq Polymerase da Promega, em situações em que a sequência do gene não era de relevância, como verificação da integridade das ligações envolvendo o gene *XylA* em vetores. Nesse caso, a reação e as condições se assemelham às descritas para a enzima *Phusion*, retirando-se o DMSO da reação e substituindo-se os 98°C da etapa de desnaturação da reação por 94°C.

### **3.15) Condições de cultivo de *Y. lipolytica***

O primeiro procedimento feito após a confirmação da inserção do gene *XylA* na *Y. lipolytica* Polg foi a elaboração de curvas de crescimento, tanto com o recém-obtido transformante quanto com o nativo. As curvas de crescimento foram feitas nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%, sendo coletado em uma primeira análise um ponto por hora, ao longo de 24h, e em outro experimento um ponto a cada três horas, ao longo 96h. Para preparar os inóculos, primeiramente foi feito um pré-inóculo em 250 mL de meio YPD colocado para crescer *overnight*. No dia seguinte, a OD desse crescimento foi medida e um volume X foi coletado (sendo esse volume X o suficiente para inocular 100 mL de meio em OD 0,1 considerando a turbidez do crescimento do pré-inóculo nos meios já citados). Todos esses crescimentos foram feitos em triplicata. Ao longo das medições de crescimento foram coletados 2 mL por amostra, para analisar o consumo de glicose e xilose durante o crescimento das leveduras. Esses valores de densidade óptica (D.O.) foram obtidos através de medidas em espectrofotômetro *Pharmacia Biotech (Ultrospec 2000)*, em cubetas de comprimento de 2cm. No momento das medições, o espectrofotômetro foi calibrado com meio de cultura referente ao crescimento, estéril, permitindo a medição do crescimento microbiano sob comprimento de onda de 600 nm (OD 600).

### **3.16) Análise do consumo de glicose e xilose**

O consumo de glicose e xilose foi feito através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um cromatógrafo *Alliance HT (Waters)*, com detector de refração *Waters 2414*. A coluna usada durante o procedimento foi do tipo Aminex HPX-87H, indicada

para a análise de monossacarídeos. Primeiramente, foram geradas curvas de calibração usando concentrações conhecidas de glicose/dextrose e xilose, contendo oito pontos de diluição, de 0 a 50 g/L. Após a determinação das curvas de diluição 500 µL de cada uma das amostras em triplicata biológica foram injetadas no equipamento para a determinação da concentração de açúcares naquele ponto de coleta. As colunas foram submetidas a 35°C, com ácido sulfúrico a 5 mM como fase móvel de transporte com fluxo de 0,6 mL/min, por 30 minutos de corrida. A análise dos resultados foi feita através do software Empower, que fez o teste t de Student para as comparações de médias. Deve-se destacar que todas as amostras em triplicatas foram filtradas através de filtros de 0,2 µm, para evitar que qualquer levedura entrasse na máquina e danificasse os capilares.

### 3.17) Extração de lipídeos

A extração de lipídeos seguiu o protocolo desenvolvido por Bligh (1959), com a diferença de que as células de levedura foram obtidas através de filtração a vácuo ao invés de método gravimétrico por centrifugação, para evitar perdas derivadas de células de *Y. lipolytica* flutuando devido ao grande acúmulo lipídico. Os meios utilizados foram YPD, YPX, YPDX 0,5%, YPDX 1,5%, YnPD, YnPX, YnPDX 0,5% e YnPDX 1,5%, com um dos transformantes obtidos e as selvagens. Inicialmente foi feita a quantificação de massa lipídica em inóculos de 350 mL de cada um dos meios citados, em triplicata, tanto com o nativa quanto com o mutante, e foram feitas coletas e quantificações nos dias 1, 3 e 5 de crescimento; a partir desses resultados, foi decidida a coleta de ponto para acúmulo lipídico após cinco dias, sendo feita a quantificação da massa lipídica usando apenas inóculos de 100 mL com os meios YPX, YnPX, YPDX 0,5% e YnPDX 0,5%, dessa vez com seis replicatas.

Seguindo o protocolo de Bligh, inicialmente foram feitos pré-inóculos de Polg tanto nativo quanto transformante em 100 mL de YPD, crescidas a 28°C, 250 rpm, *overnight*. No dia seguinte essas culturas tiveram suas ODs medidas, e um determinado volume tal que a diluição dele em 100 mL de meio de cultura novo foi calculado e coletado para obter OD inicial 0,1. Deve-se ressaltar que esse volume X teve suas células precipitadas em centrífuga (14.000 rpm, 60 segundos) e lavadas duas vezes com água miliQ ultrapura para retirar todo o meio YPD restante, evitando que a glicose presente no meio inicial interferindo o crescimento futuro. Os inóculos feitos nesse momento foram mantidos a 28°C, 250 rpm durante cinco dias, tempo necessário para alcançar a fase estacionária e se iniciar o acúmulo lipídico.

Após os cinco dias de crescimento coletou-se 40 mL do inóculo em um tubo de 50 mL e outros 40 mL em outro tubo. A seguir, essas amostras foram submetidas a filtração à vácuo com filtros de acetato/nitrato 0,45 (*Milipore*), para se obter apenas as células contendo lipídeo intracelular. Uma dessas duplicatas foi destinada para secagem em estufa a 60°C por dois dias, para determinar a massa seca total por pesagem (incluindo lipídeos); a outra foi destinada para a extração da fração lipídica da amostra. Primeiramente ela foi lavada com 4 mL de ácido clorídrico 83%, sendo agitada vigorosamente por dois minutos para lavagem do filtro e lise celular – o filtro foi retirado logo a seguir dessa etapa. A seguir, essa amostra ácida foi incubada a 80°C por uma hora. Após a etapa de aquecimento foi feita uma centrifugação a 4.000 rpm, 4°C, por 25 minutos, e o sobrenadante foi descartado em frasco apropriado. O precipitado formado foi ressuspenso em 4 mL de metanol e 4 mL de clorofórmio, com dois minutos de agitação intensa após cada adição, e mantidas sob agitação intensa constante (250 rpm, em shaker) por uma hora. Após esse período, foi adicionado 3,6 mL de água destilada, com um minuto de agitação intensa a seguir, a uma última centrifugação a 2.000 rpm, 4°C, por 10 minutos foi feita, da qual foi obtida uma amostra com três fases: a superior, com metanol e compostos polares em suspensão, a intermediária, sólida, com todo o material orgânico complexado, e a inferior, composta por uma solução de clorofórmio com lipídeos. Essa última fase foi coletada com agulha e seringa, transferida a um novo tubo, e mantida sob secagem em capela ao longo de quatro dias.

Deve-se ressaltar que o protocolo de Blight foi modificado nas etapas de obtenção das células após crescimento lipídico, onde foi substituída o procedimento gravimétrico na centrífuga por uma filtração a vácuo com filtros de acetato/nitrato, e na etapa de secagem, onde a secagem sob vácuo foi substituída por uma secagem mais longa sob sucção se vapores em capela.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1) Seleção dos genes *xylA* de interesse para expressão em *Y. lipolytica*

A primeira atividade realizada durante o mestrado foi a seleção de sequências de genes de xilose isomerase de diferentes microrganismos. A partir de três sequências do mesmo gene que já foram transformadas e expressas com sucesso em *S. cerevisiae*, vindas de três microrganismos distintos, a busca por homólogos foi realizada através do algoritmo nBlast, do NCBI. As sequências iniciais foram obtidas do genoma de *Agrobacterium tumefaciens* (linhagem C58), *Orpinomyces sp. Ukk1* e de *Piromyces* (linhagem E2), e delas foram obtidas dez outras sequências, listadas na **Tabela 4** a seguir. Os critérios utilizados foram que os genes selecionados tivessem o máximo de similaridade de sequências possível, o menor e-Value possível e que eles ainda não tivessem sido estudados, para evitar o confronto da pesquisa em desenvolvimento com outros resultados já publicados e/ou com cobertura por patentes.

### 4.2) Síntese do gene *xylA* com *códon usage* otimizado

As sequências dos genes indicados na **Tabela 4** foram sintetizadas por empresa contratada para este fim, convertendo os códons utilizados nos microrganismos originais para os códons utilizados por *Y. lipolytica*. Isso é importante, pois cada organismo apresenta uma preferência por determinados códons em detrimento por outros, sem necessariamente mudar os aminoácidos resultantes da tradução dos RNAs mensageiros, graças à degeneração do código genético; essa preferência na utilização de determinados códons deriva da história evolutiva de cada espécie, se refletindo nas proporções GC dos genomas e quantidade no número de cópias gênicas de cada RNA transportador (com códons de maior preferência apresentando maior número de cópias dos genes dos RNA transportadores que apresentem os anti-códons respectivos), entre outras diferenças (Lanza et al., 2014). De fato, Lithwick & Margalit (2003) indicam que esse processo de conversão de códons sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína final – chamado otimização do *codon usage* – é um dos fatores principais que influenciam a expressão heteróloga de proteínas em bactérias, e diversos grupos de pesquisa distintos apontaram que o mesmo procedimento leva a altas taxas de sucesso para leveduras (Kaishima et al., 2015; Gustafsson et al., 2004; Sheff & Thorn, 2004).

**Tabela 4:** Lista dos microrganismos com gene *xylA* selecionados, com o tamanho do gene e seu nome registrado.

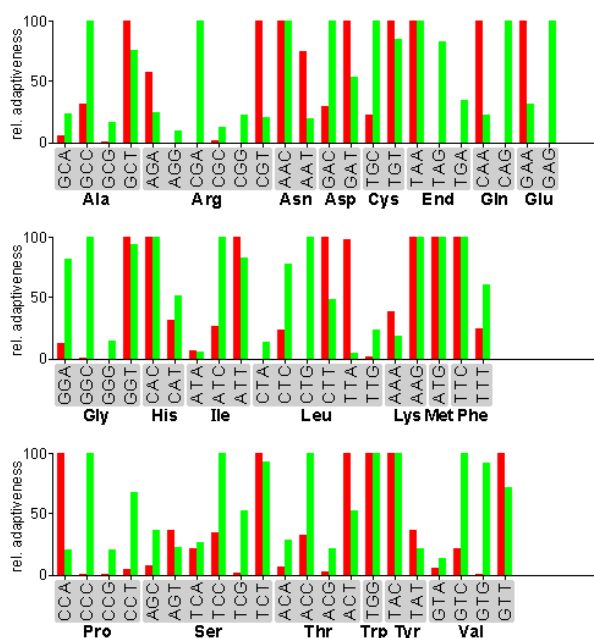
<b>Microrganismos selecionados</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Nome do gene</b>
<i>Piromyces strain E2</i>	1315 bp	<i>xylA</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens strain c58</i>	1308 bp	<i>xylA</i>
<i>Orpinomyces sp. Ukk1</i>	1311 bp	Xylose isomerase
<i>Bacteroides stecoris strain HJ-15</i>	1311 bp	Xylose isomerase
<i>Tannerella forsythia 92°2</i>	1122 bp	Sem nome
<i>Bacteroides ovatus strain ATCC 8483</i>	1122 bp	Sem nome
<i>Bacteroides cellulosilyticus strain WH2</i>	1122 bp	Sem nome
<i>Xanthomonas campestris strain ICMP 4013</i>	1125 bp	Sem nome
<i>Balliella baltica DSM 15883</i>	1128 bp	Sem nome

A premissa básica da técnica é substituir os códons presentes na sequência do gene do organismo de origem por códons que tenham utilização privilegiada pelo organismo no qual se intenta a expressão heteróloga da sequência genética. Embora apenas sua aplicação não leve necessariamente a uma maior expressão gênica, os trabalhos anteriormente citados, além de outros na literatura, indicam que esse procedimento é eficaz na superação de um dos gargalos que levam a falhas na expressão heteróloga de genes entre organismos de distante relação filogenética.

A síntese dos novos genes otimizados foi realizada pela empresa Fastbio. Entretanto, devido ao alto preço individual de cada gene otimizado, foi decidido que apenas utilizaríamos o gene xilose isomerase de *Piromyces spp. Strain E2*, por esse gene já ter sido estudado e expresso com sucesso na levedura-modelo *S. cerevisiae*, o que em teoria nos daria maior chance de sucesso na expressão heteróloga.

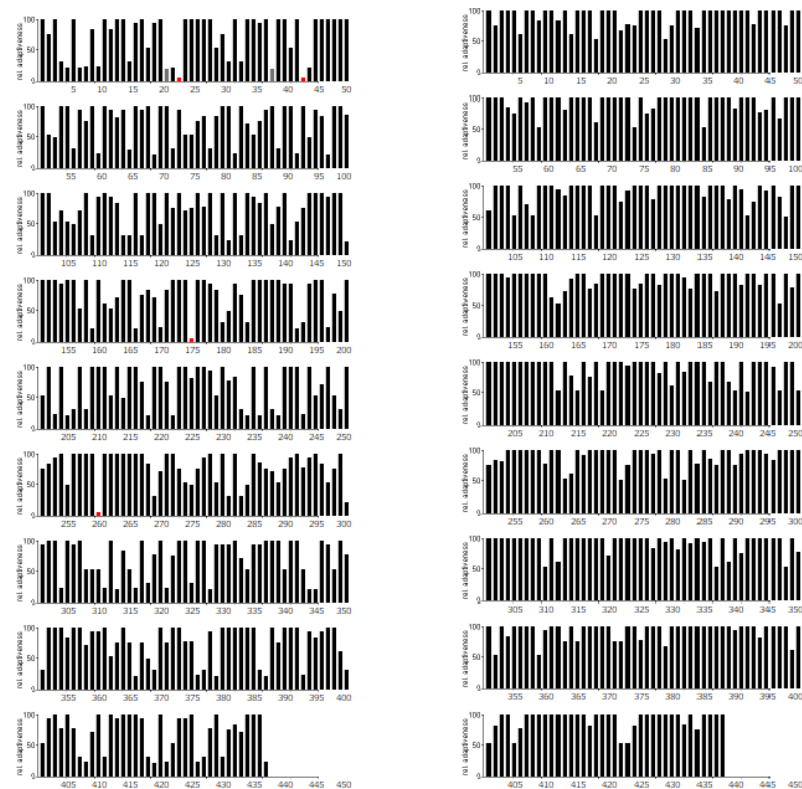
A utilização dessa técnica no trabalho, ao se escolher utilizar *Piromyces spp. strain E2*, se justifica pelas grandes diferenças no codon usage entre *Y. lipolytica* e *Piromyces spp.*, ilustradas na **Figura 4**, que mostra uma comparação da utilização de códons entre *Yarrowia lipolytica* e *Piromyces spp. Strain E2*, retirada do software GCUA – *Graphical Codon Usage Analyser*. No caso, as barras vermelhas se referem a *Piromyces*, e as verdes a *Yarrowia*. Por exemplo, na utilização de prolina, *Piromyces* tem maior frequência do códon CCA, enquanto *Yarrowia* usa preferencialmente CCC, mas no que se refere a tirosina, a utilização dos códons TAC e TAT é praticamente idêntica entre os microrganismos. Como indicado na mesma figura, a diferença média no *codon usage* entre os dois microrganismos é 40,7%, justificando a otimização.

Mean difference: 40.7 %



**Figura 4:** Gráficos de comparação dos códons preferencialmente usados por *Piromyces spp. strain E2* (vermelho) com relação aos códons utilizados por *Y. lipolytica* (verde). Gráfico gerado em software GCUA – *Graphical Codon Usage Analyser* (Fuhrmann et al., 2004).

De posse da sequência do gene otimizado, os códons da sequência original e da sequência otimizada foram comparados com a utilização preferencial de códons em *Yarrowia*. A diferença de resultados, apresentada na **Figura 5**, mostra como a sequência otimizada identifica-se mais com o usage de *Yarrowia* do que a sequência original, indicando assim que o gene sintético é mais adequado do que o natural de *Piromyces*.

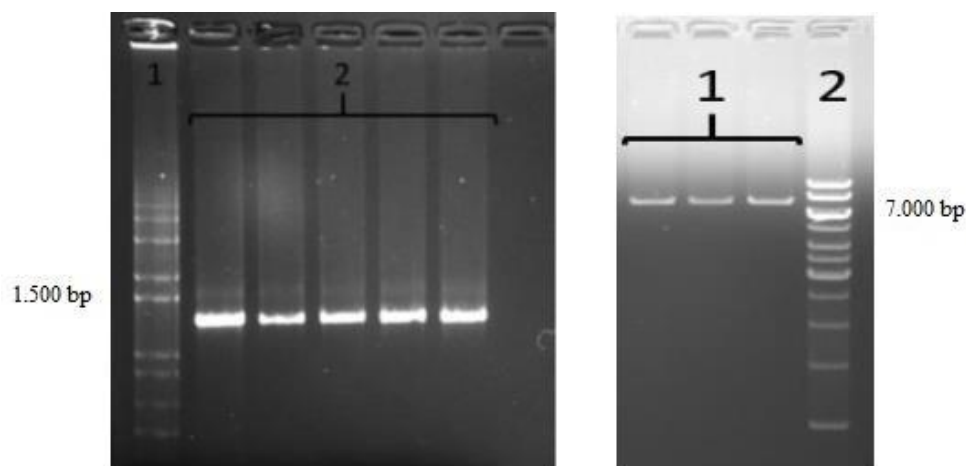


**Figura 5:** Gráficos de comparação dos códons presentes na sequência do gene *xylA* natural (à esquerda) e do gene *xylA* otimizado comprado (à direita) com a utilização preferencial de códons por *Yarrowia lipolytica*. À esquerda, está a comparação da utilização de códons de *Yarrowia* considerando a sequência do gene *xylA* original, e na direita está a mesma comparação, mas usando o gene *xylA* otimizado. Quanto mais próximas de 100, maior a chance de o dito códon ser reconhecido e utilizado pela levedura – na imagem da esquerda, a maior parte das barras oscila entre 0 e 50, mas na figura da direita todas tem distribuição acima de 50, indicando que na teoria o processo de otimização foi bem-sucedido. Gráfico gerado em software GCUA – *Graphical Codon Usage Analyser* (Fuhrmann et al., 2004).

#### 4.3) Construção do cassete de expressão heteróloga *xylA* + pYLEX

Para a construção do cassete de expressão, o gene *xylA* otimizado clonado no vetor pUC57, obtido da empresa Fastbio, foi amplificado em uma reação de PCR com polimerase de alta fidelidade utilizando os primers XylA\_for\_Bam e XylA\_rev\_Kpn, de

modo a incluir os sítios de restrição de *Bam*HI e *Kpn*I nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Como explicado anteriormente, a posição desses sítios específicos era vital para a clonagem na posição correta do gene no vetor de expressão pYLEX. Para gerar os mesmos sítios no vetor de expressão, o pYLEX também foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. A **Figura 6** mostra os resultados dessas manipulações em corrida de eletroforese, apresentando à esquerda a corrida da amplificação do gene *xylA* com seus primers específicos, resultando em uma banda de tamanho esperado (1.382 bp, logo abaixo da banda de 1.500 bp do marcador), e à direita a digestão do vetor pYLEX com *Bam*HI e *Kpn*I, resultando em uma banda de 7.200 bp, acima do marcador de 7.000 bp, conforme esperado.



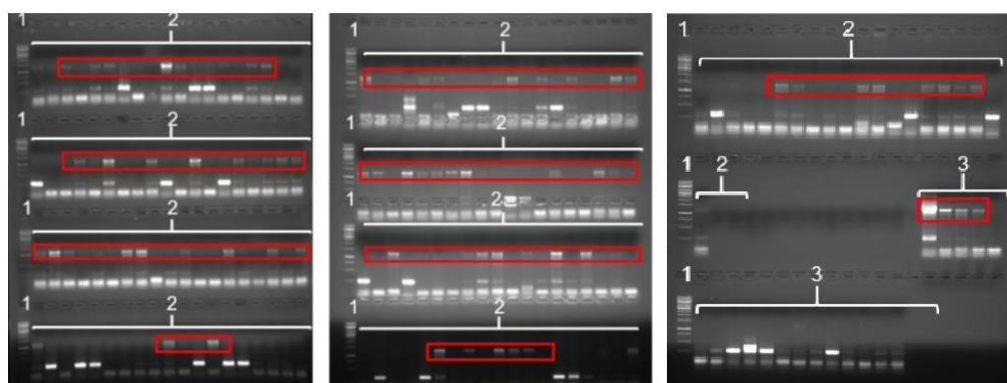
**Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (1%) demonstrando as etapas necessárias à construção do cassete de expressão.** Na esquerda, é mostrado o resultado da amplificação do gene *xylA* com primers contendo os sítios para *Bam*HI e *Kpn*I, gerando o amplicom *Bam*HI-XylA-*Kpn*I, de 1382 bp, sendo 1 o marcador 1 kb Fermentas e 2 as bandas referentes à cinco reações de amplificação. Na direita tem-se o resultado da digestão do vetor de expressão pYLEX com *Bam*HI e *Kpn*I, gerando um material genético de 7.200 bp linearizado, com 1 sendo o resultado de três reações de digestão e 2 o marcador 1 kb Fermentas.

Após a etapa de amplificação do gene *xylA*, ele foi adenilado e ligado ao vetor plasmidial pGEM-T-Easy e transformado em *E. coli* eletrocompetentes. Após uma sequência de inóculo, extração plasmidial em pequena escala da construção XylA+pGEM, digestão dessa mesma construção com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I e purificação dessa reação, obteve-se amostra digerida do gene *xylA* com os sítios de restrição prontos para ligação ao vetor pYLEX já digerido, seguindo-se ligação do material genético dessa purificação com o vetor pYLEX

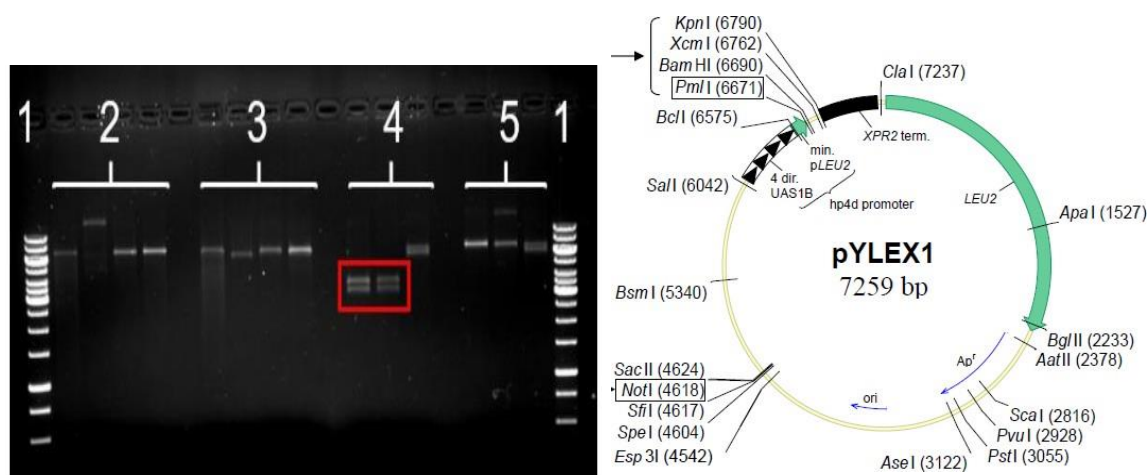
linearizado, e transformação e seleção de bactérias eletrocompetentes com os cassetes formados.

Para contornar a seleção de clones falsos positivos, foi realizado PCR de colônia com primers para o gene *xyIA* com todas as colônias resultantes de placas LB com ampicilina, em um total de 182 reações. A **Figura 7** mostra o resultado desse procedimento. De 182 colônias, um total de 49 resultaram em amplificação do gene *xyIA*.

Em seguida, foi realizada mais uma seleção, com dez das 49 colônias positivas, onde os plasmídeos resultantes de extração plasmidial foram digeridos com enzimas de restrição *SalI*, *BamHI* e *KpnI*, *ScaI* e *AatI*. A **Figura 8** apresenta os resultados dessas digestões, com a banda dupla resultante da digestão com *ScaI* também em destaque com um retângulo vermelho para os dois clones positivos.



**Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1%) demonstrando as etapas necessárias à construção do cassete de expressão, com os PCRs de colônia feitos para analisar quais transformantes carregavam o gene *xyIA* nos plasmídeos internalizados.** Foram corridos três géis pois todas as 182 amostras não couberam em apenas 1. Nos retângulos estão as bandas de tamanho esperado do *xyIA*, 1382 bp, totalizando 49 positivos. Em todos os géis, 1 se refere ao marcador 1 kb Fermentas e 2 e 3, às 182r amplificações.



**Figura 8: Fotos de eletroforese das digestões de confirmação de dez dos 49 positivos obtidos.** Totalizam 4 reações por ter que dividir as amostras, devido à pequena quantidade das enzimas utilizadas no laboratório. Em destaque, as duas reações que deram o padrão de bandas procurado. Em 1 tem-se o marcador 1 kb Fermentas, em 2 quatro amostras digeridas com *SalI*, em 3 as mesmas quatro amostras digeridas com *BamHI* e *KpnI*, em 4 três outras amostras digeridas com *ScaI* e em 5 as três últimas amostras digeridas com *AatI*. Como possível observar no mapa à direita, o sítio para *ScaI* está no bp 2.816, enquanto há também um sítio para a mesma enzima no meio do gene otimizado, no bp 13; a digestão da construção pYLEX+*xylA* com essa enzima gerará duas bandas, uma de 3.887 bp e outra de 4.686 bp, como indicado na eletroforese.

Como indicado na **Figura 8**, dois clones carregavam a construção XylA+pYLEX intacta. Essas duas amostras tiveram as colônias transformadas em colônias permanentes e maior quantidade de plasmídeo foi extraída para os procedimentos seguintes, sendo o vetor propriamente linearizado com a enzima *NotI* para possibilitar a recombinação homóloga do cassete no genoma, na região pBR do genoma de *Yarrowia*.

#### 4.4) Transformação genética de *Y. lipolytica* Po1g com o cassete de expressão XylA+pYLEX

Em seguida, foi realizada a etapa de inserção do gene *XylA* no genoma de *Y. lipolytica*, seguindo as recomendações do kit de transformação e expressão YLEX (Yeastern Biotech Co.), com algumas modificações apontadas na literatura (Qiao et al., 2015; Li, 2016; Jolival, 2005). Estes e outros trabalhos mais antigos abordaram a adaptação de protocolos de transformação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o método de acetato de lítio, levando em consideração as particularidades fisiológicas de *Yarrowia lipolytica* (Nicaud, 1991; Le Dall, 1993). Tais artigos focaram no fato de que *Y. lipolytica* acumula altas taxas lipídicas quando comparadas com *S. cerevisiae*, de modo que alguns parâmetros do protocolo de

acetato de lítio (Sambrook & Russel, 2001) foram modificados para compensar essa diferença, sendo eles: concentração de acetato de lítio, temperatura de incubação com o vetor e o DNA carreador, além do tempo e a velocidade de centrifugação para obtenção de células competentes.

Entre as funções não-canônicas das reservas lipídicas em eucariotos está a propriedade de servir como depósito de compostos tóxicos (Thiam, Farese Jr & Walther, 2013). Hipotetiza-se que o acetato de lítio utilizado nos procedimentos de transformação de microrganismos como modo de desestabilizar a membrana celular, criando poros pelos quais os cassetes de expressão podem penetrar no meio intracelular; (Sambrook & Russel, 2001), possa ser depositado nas vesículas lipídicas de *Yarrowia*, levando à menor eficácia de transformação desses microrganismos oleogênicos. Para reverter essa limitação, adicionamos acetato de lítio em maior concentração durante nossos procedimentos de transformação.

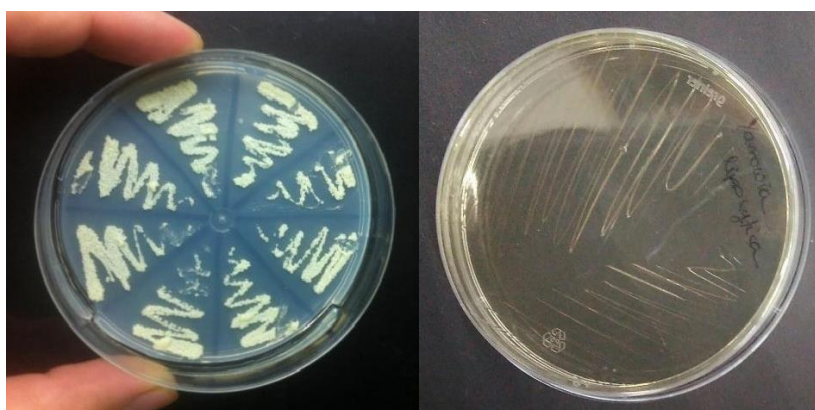
No que diz respeito à tempo e velocidade de centrifugação e tempo e temperatura de incubação, são fatores influenciados pelas propriedades físico-químicas de lipídeos. Lipídeos são compostos menos densos que a água, de modo que microrganismos que apresentam grandes quantidades deles flutuam quando em contato com soluções aquosas. Do mesmo modo, a composição como longas cadeias carbônicas e propriedades das ligações químicas dessas moléculas fazem com que elas atuem como ótimos isolantes térmicos, protegendo os organismos que acumulam gorduras das mudanças de temperatura do meio (Favé, Coste & Armand, 2004; Thiam, Farese Jr & Walther, 2013). De modo análogo à situação com o acetato de lítio, teorizou-se que seria necessário aumentar tanto a temperatura como as velocidades de centrifugação, para garantir o choque térmico e a formação de sedimentos de células durante os procedimentos de transformação.

Além dessas mudanças, a quantidade de vetor *xylA*+pYLEX foi aumentada, seguindo a seção de resolução de problemas do protocolo comercial. A **Tabela 5** traz as mudanças realizadas no protocolo de transformação YLEX que, quando aplicadas em conjunto, possibilitaram que a linhagem Po1g fosse transformada com sucesso, crescendo em meio auxotrófico leu-. A **Figura 9** a seguir apresenta a placa derivada das 8 colônias transformadas de *Yarrowia lipolytica* Po1g que cresceram em meio seletivo, junto da foto da placa riscada com o controle.



**Tabela 5:** Etapa do protocolo, condição ordenada pelo protocolo de transformação YLEX e a mesma condição após sua otimização.

Etapa do protocolo	Condição indicada no protocolo	Condição depois da otimização
Temperatura de incubação durante o choque térmico	40 minutos, 38°C	80 minutos, 40°C
Centrifugação para coleta de células a serem transformadas	5 minutos, 4.000 rpm	8 minutos, 10.000 rpm
Concentração de acetato de lítio	70 mM	100 mM
Massa de vetor XylA+pYLEX	40 ng	100 ng

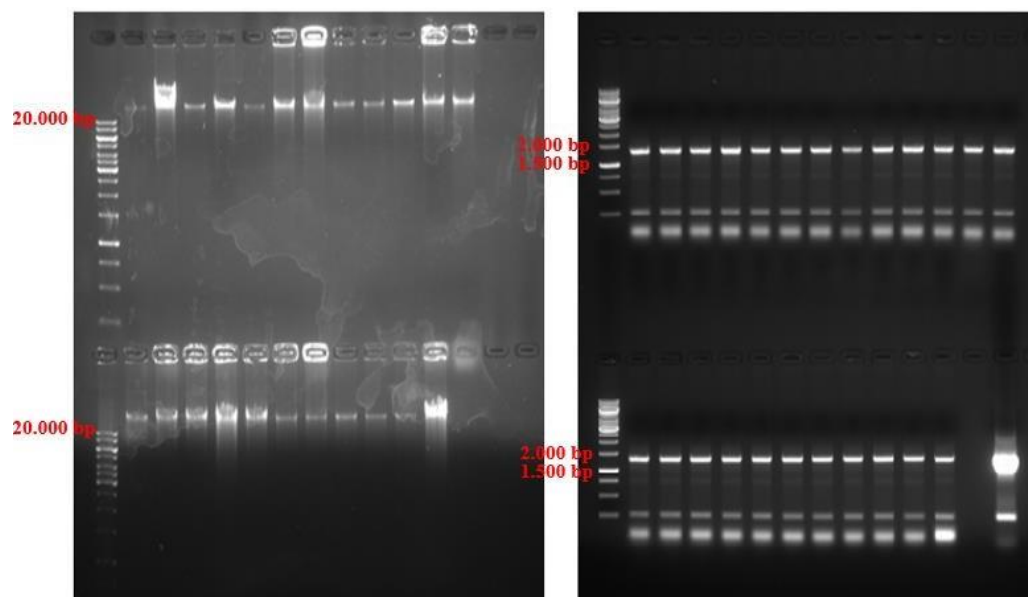


**Figura 9:** *Y. lipolytica* Po1g transformada com o cassete de expressão XylA+pYLEX crescendo em meio auxotrófico leu-, indicando que o cassete foi devidamente inserido no genoma. À esquerda, a placa inoculada com transformantes; à direita, o mesmo meio auxotrófico inoculado com leveduras selvagens sujeitas ao protocolo de transformação, mas sem conter material genético.

#### 4.5) Análises para confirmar a inserção do transgene no genoma e sua expressão: extração de DNA cromossômico e RNA total

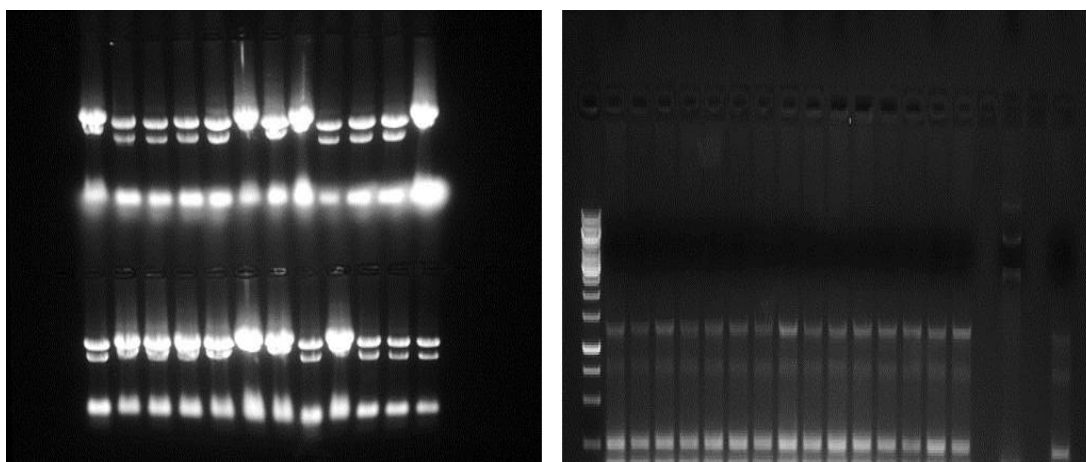
De posse de leveduras presumidamente transformadas, crescendo em meio YNB leu-, foi realizado um inóculo em meio líquido para extrair DNA cromossômico e RNA total, com objetivo de subsequentemente verificar se, de fato, o transgene foi integrado no genoma após recombinação homóloga e é expresso. Para evitar a presença de falsos positivos, as extrações e amplificações foram realizadas com múltiplas colônias (**Figura 10**). Após extração de DNA cromossômico, verificou-se a presença de bandas de grande peso molecular após eletroforese em gel, como esperado para esse tipo de molécula (Figura 10, à esquerda).

Mais importante, foi verificada a amplificação do gene *xyIA* a partir de tais amostras de DNA genômico, resultando em banda de tamanho esperado (Figura 10, à direita).



**Figura 10: Extração de DNA cromossomal da Po1g transformada com o cassete de expressão XylA+pYLEX (esquerda) e amplificação do gene *XylA* a partir desse DNA extraído (direita).** A alta posição das bandas do primeiro gel, mais altas que qualquer banda do marcador 1 kb Fermentas, indica que de fato se trata de DNA cromossomal; a banda das amostras, abaixo da banda de 1.500 bp do marcador, está de acordo com o tamanho de 1304 bp do gene amplificado.

Aliado à análise que confirmou a inserção do transgene no genoma, realizamos a verificação da expressão do gene de interesse. Para tanto, RNA total foi extraído dos mesmos inóculo, seguido de síntese de cDNA e subsequente reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *xyIA* (**Figura 11**). Após eletroforese em gel de agarose, verificou-se que as amostras de RNA total extraídas possuem as três bandas características desse tipo de amostra (Figura 10, à esquerda) quando devidamente extraído, a saber: RNA 28S, 18S e 5S. De modo significativo, a amplificação do gene *xyIA* foi possível a partir das amostras de cDNA (Figura 11, à direita), confirmando que o transgene inserido no genoma está sendo expresso.



**Figura 11: Extração de RNA total da Po1g transformada com o cassete de expressão *xylA*+pYLEX (esquerda) e amplificação do gene *xylA* a partir do DNA complementar sintetizado usando o RNA total como template (direita).** O padrão de bandas confirma que se trata de amostras de RNA total extraídos, enquanto que as bandas obtidas das amplificações se encontram no tamanho esperado para o gene xilose isomerase. Em ambos os casos, os controles positivo e negativo são as penúltima e última columnas dos géis, respectivamente. O controle positivo para a extração de RNA total foi a extração feita com uma colônia nativa de Po1g, e o negativo foi uma extração usando água ao invés de material biológico; o controle positivo para a amplificação do gene *xylA* a partir do cDNA foi uma alíquota do vetor *xylA*+pYLEX e o negativo foi a amplificação usando o RNA total extraído da colônia nativa.

#### 4.6) Testes fenotípicos: curvas de crescimento

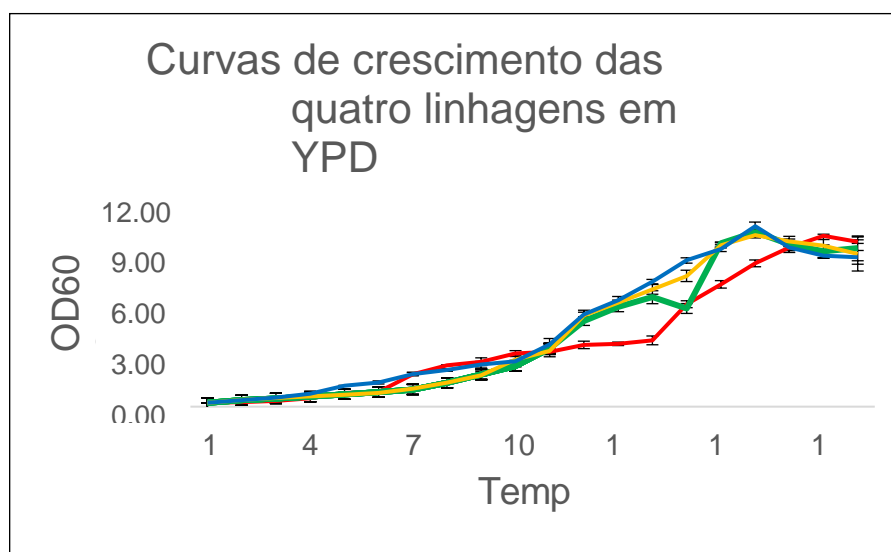
De posse das linhagens geneticamente modificadas, iniciamos uma série de testes de caracterização fenotípica. Inicialmente, obtivemos curvas de crescimento da nova linhagem transformada, utilizando a nativa Po1g como controle. Foram realizadas análises com três colônias transformantes, como réplicas biológicas, para verificar se o comportamento entre eles era reprodutível entre todos os transformantes, em comparação com leveduras não transformadas como controle.

As células foram inoculadas em meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%. Conforme já explicitado, tais meios diferem em termos da fonte de carbono e sua proporção relativa. Houve coleta de material a cada quatro horas, seguido de análise de consumo de fonte de carbono por HPLC.

As **Tabelas 6 e 7** e a **Figura 12** apresentam os resultados de crescimento obtidos para a linhagem Po1g nativa, as **Tabelas 8 e 9** e a **Figura 13** apresentam os resultados de crescimento obtidos para o transformante 1, as **Tabelas 10 e 11** e a **Figura 14** apresentam os

resultados de crescimento obtidos para o transformante 2 e as **Tabelas 12 e 13** e a **Figura 15** apresentam os resultados de crescimento obtidos para o transformante 3. Como é possível observar tanto nas tabelas quanto nas figuras, o crescimento em YPX foi interrompido no ponto 15 (hora 60) pois a partir desse ponto não houve mudança de absorbância da cultura e, portanto, evidência de crescimento dos microrganismos.

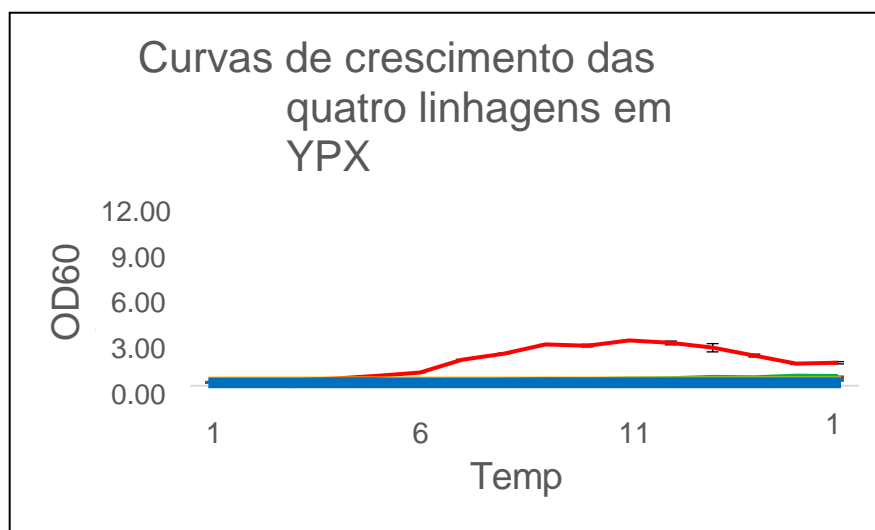
A **Figura 12** apresenta os quatro gráficos do crescimento da levedura *Polg* nativa e das três transformantes em meio YPD, sob a forma de gráfico de linhas, sendo que todos os pontos apresentam erro padrão da média (conforme apresentado nas **Tabelas 6,8, 10 e 12**). Em meio YPD, houve uma fase de adaptação indo da medição 1 até a medição 6; a fase de crescimento exponencial abrange as medições 6 até 16; a fase estacionária se inicia na 17, para todas as linhagens. A nativa apresenta um pequeno atraso de crescimento, mas alcança a fase estacionária assim como as outras três linhagens. A escala de todos abrange valores de 0 a 12, números entre os quais as OD variaram ao longo das medições.



**Figura 12:** Gráfico com as curvas de crescimento da linhagem nativa e das transformantes 1, 2 e 3 feitas com base nos dados coletados durante o crescimento ao longo de 96 horas no meio YPD. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. É possível notar nos gráficos que o crescimento das leveduras nesse meio é praticamente idêntico, com a fase de adaptação acabando em torno do ponto 10, a fase de crescimento englobando os pontos de 10 até 16, e a estacionária a partir daí. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.

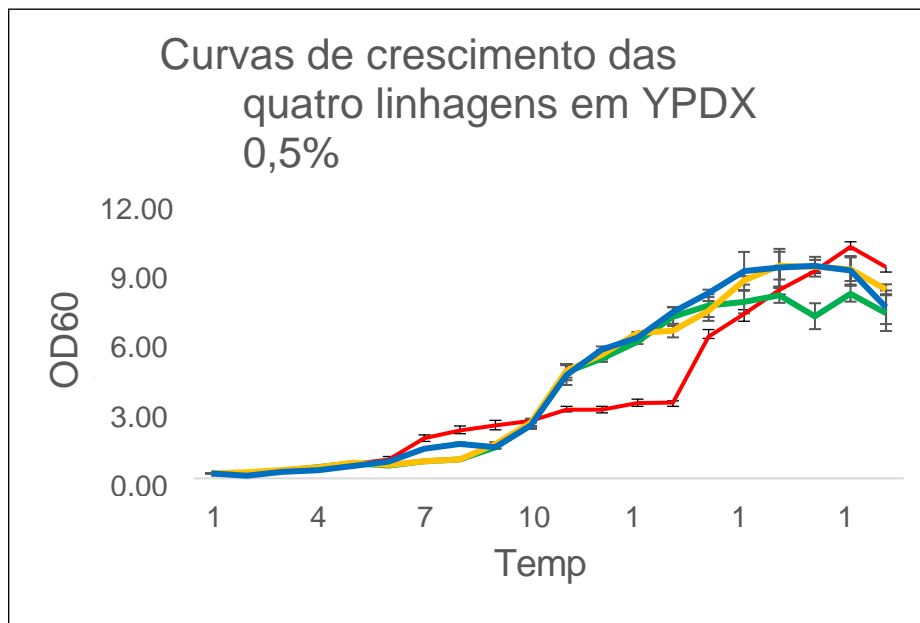
A **Figura 13** apresenta os quatro gráficos do crescimento da levedura *Polg* nativa e das três transformantes em meio YPX, sob a forma de gráfico de linhas, sendo que todos os pontos apresentam erro padrão da média (conforme apresentado nas **Tabelas 6,8, 10 e 12**).

Nesse crescimento é possível notar que as linhagens transformantes sequer cresceram, não sendo sequer possível distinguir as fases do crescimento. Por outro lado, a selvagem apresenta um bom crescimento, com a fase de adaptação se estendendo até o ponto 5, a de crescimento abrangendo os pontos entre 6 e 9, e a estacionária se iniciando no ponto 10. A escala de todos abrange valores de 0 a 12, números entre os quais as OD variaram ao longo das medições.



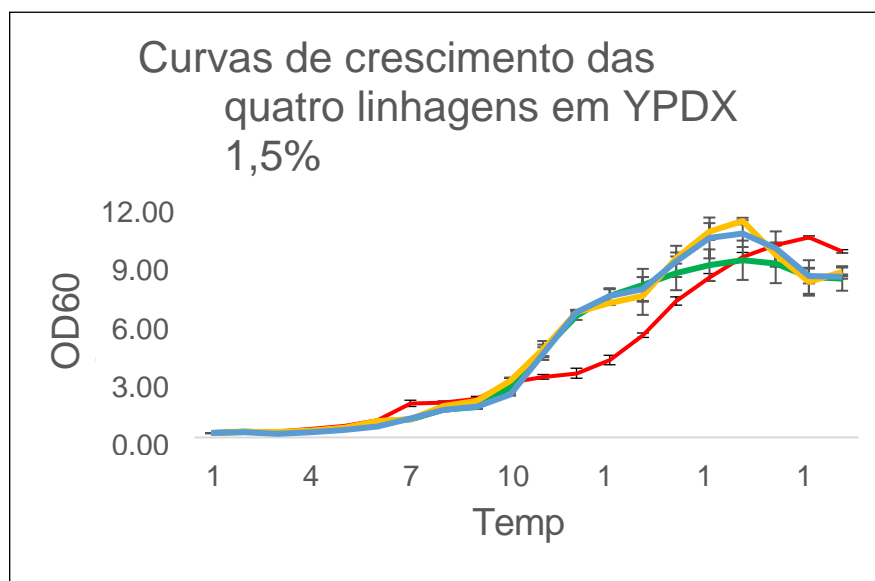
**Figura 13:** Gráfico com as curvas de crescimento da linhagem nativa e das transformantes 1, 2 e 3 feitas com base nos dados coletados durante o crescimento ao longo de 96 horas no meio YPX. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. É possível notar nos gráficos que o crescimento das leveduras transformantes nesse meio é idêntico e extremamente baixo, não sendo sequer possível distinguir as diferentes fases; em contrapartida, a selvagem tem um crescimento consideravelmente melhor, com a fase de adaptação se prolongando até 5, uma curta fase de crescimento de 6 a 9 e a fase estacionária a partir de 10. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.

A **Figura 14** apresenta os quatro gráficos do crescimento da levedura Polg nativa e das três transformantes em meio YPD 0,5%, sob a forma de gráfico de linhas, sendo que todos os pontos apresentam erro padrão da média (conforme apresentado nas **Tabelas 7, 9, 11 e 13**). Nesse crescimento é possível notar que as linhagens transformantes crescem bem, inclusive melhor do que a nativa; a fase de adaptação se encerra na medição da amostra 7, seguida por uma fase de crescimento intensa e longa que dura de 7 a 14, seguida pela fase estacionária em 15. Por outro lado, a selvagem apresenta um bom crescimento, com a fase de adaptação se estendendo até o ponto 12 ou 13, a de crescimento abrangendo os pontos entre 13 e 17, e a estacionária se iniciando no ponto 18. A escala de todos abrange valores de 0 a 12, números entre os quais as OD variaram ao longo das medições.



**Figura 14:** Gráfico com as curvas de crescimento da linhagem nativa e das transformantes 1, 2 e 3 feitas com base nos dados coletados durante o crescimento ao longo de 96 horas no meio YPD 0,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. É possível notar nos gráficos que o crescimento das leveduras transformantes nesse meio é idêntico alto, com a fase estacionária sendo logo superada e seguida por um crescimento intenso; em contrapartida, a nativa tem um crescimento pior, com a fase de adaptação se prolongando até 12-13, uma curta fase de crescimento de 13 a 17 e a fase estacionária a partir de 18. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.

A **Figura 15** apresenta os quatro gráficos do crescimento da levedura Polg nativa e das três transformantes em meio YPD 1,5%, sob a forma de gráfico de linhas, sendo que todos os pontos apresentam erro padrão da média (conforme apresentado nas **Tabelas 7,9, 11 e 13**). Nesse crescimento é possível notar que as linhagens transformantes crescem bem, inclusive melhor do que a nativa; a fase de adaptação se encerra na medição da amostra 7, seguida por uma fase de crescimento intensa e longa que dura de 7 a 14, seguida pela fase estacionária em 15. Por outro lado, a selvagem apresenta um bom crescimento, com a fase de adaptação terminando junto com a das transformantes, mas a de crescimento apresenta um desempenho inferior se comparada com as leveduras modificadas. A escala de todos abrange valores de 0 a 12, números entre os quais as OD variaram ao longo das medições.



**Figura 15:** Gráfico com as curvas de crescimento da linhagem nativa e das transformantes 1, 2 e 3 feitas com base nos dados coletados durante o crescimento ao longo de 96 horas no meio YPDx 1,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. É possível notar nos gráficos que o crescimento das leveduras transformantes nesse meio é idêntico alto, com a fase estacionária sendo logo superada e seguida por um crescimento intenso; em contrapartida, a nativa tem um crescimento similar com as transformantes, mas com uma fase de crescimento apresentando uma menor intensidade, embora a estacionária seja alcançada ao mesmo tempo que as transformantes. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.

#### 4.7) Testes fenotípicos: consumo de glicose e xilose

Como citado anteriormente, em paralelo à obtenção de amostras para medição de absorbância e elaboração da curva de crescimento, também foram coletados 2 mL para quantificar as concentrações de glicose e xilose em cada ponto, de modo a elaborar curvas de consumo de glicose e xilose. Para tanto, foram analisadas três colônias transformantes (réplicas biológicas), abrangendo 70 horas de crescimento. As células foram inoculadas em meios YPD, YPX, YPDx 0,5% e YPDx 1,5%, sendo realizadas coletas a cada seis horas.

As Tabelas 14, 15 e 16 e a Figura 16 apresentam os resultados de crescimento obtidos para a linhagem Polg nativa, as Tabelas 17, 18, e 19 e a Figura 17 apresentam os resultados de crescimento obtidos para o transformante 1, as Tabelas 20, 21 e 22 e a Figura 18 apresentam os resultados de crescimento obtidos para o transformante 2 e as Tabelas 23, 24, e 25 e a Figura 19 apresentam os resultados de crescimento obtidos para o transformante 3. Como é possível observar tanto nas tabelas quanto nas figuras, o crescimento em YPX foi interrompido na amostra 15 (60h) pois não houve crescimento da cultura além desse ponto.

Cada gráfico citado no parágrafo anterior mostra a concentração total de açúcares restantes no meio (glicose ou xilose) no momento da coleta, representando o consumo temporal de açúcares. Neles pode-se observar um intenso consumo de glicose em todos os meios que apresentam esse composto (YPD, YPD<sub>X</sub> 0,5% e YPD<sub>X</sub> 1,5%, **Figuras 16, 17, 18 e 19**, nos seus respectivos gráficos), sempre levando à sua exaustão, tanto nas leveduras não transformadas quanto nos três transformantes. Por outro lado, a linhagem nativa pouco consome xilose quando esta é a única fonte de carbono; entretanto, quando há disponibilidade simultânea de glicose e xilose no meio, xilose passa a ser consumida lentamente após a exaustão de glicose. De modo importante e significativo, o quadro se inverte quando se analisam as linhagens transformantes: as três linhagens transformantes têm o mesmo comportamento que a linhagem não transformada em termos de perfil de consumo de glicose, mas o comportamento de consumo de xilose é melhor do que para a linhagem nativa. Percebe-se isso quando se compara a variação de xilose restante no meio em cada caso:

- Para a linhagem nativa, a variação de xilose no meio YPX foi de 0,45 g/L, uma variação de 2,12% de massa carbônica no meio, considerando o valor final em relação ao valor inicial (**Tabela 14**). No meio YPD<sub>X</sub> 0,5% foi de 16,09 g/L (90,59%, **Tabela 15**) e, no meio YPD<sub>X</sub> 1,5%, foi de 4,22 g/L (57,18%, **Tabela 16**);
- Na linhagem transformante 1 tem-se a variação de xilose constando em 3,21 g/L, 15,81 g/L e 0,56 g/L, variações de massa carbônica de 14,96%, 94,73% e 8,22% nos meios YPX, YPD<sub>X</sub> 0,5% e YPD<sub>X</sub> 1,5%, respectivamente (**Tabelas 17, 18 e 19**);
- Na linhagem transformante 2 tem-se a variação de xilose constando em 2,92 g/L, 13,05 g/L e 4,2 g/L, variações de massa carbônica de 17,01%, 97,02% e 69,19% nos meios YPX, YPD<sub>X</sub> 0,5% e YPD<sub>X</sub> 1,5%, respectivamente (**Tabelas 20, 21 e 22**);
- Por fim, nas análises com a linhagem transformante 3 tem-se a variação de xilose constando em 5,12 g/L, 4,94 g/L e 3,7 g/L, variações de massa carbônica de 31,28%, 35,43% e 60,86% nos meios YPX, YPD<sub>X</sub> 0,5% e YPD<sub>X</sub> 1,5%, respectivamente (**Tabelas 20, 21 e 22**).

Todas essas variações podem ser consultadas em forma de gráficos nas **Figuras 16, 17, 18 e 19** nos gráficos que se referem aos meios YPX, YPD<sub>X</sub> 0,5% e YPD<sub>X</sub> 1,5%. Para



facilitar as comparações das variações foram criadas as **Figuras 20, 21, 22 e 23**, carregando em si todos os gráficos de consumo de carboidrato separados por tipo de fonte de carbono (glicose ou xilose) e meio de cultura (YPD, YPX, YPDX 0,5% ou YPDX 1,5%).

Entretanto, deve-se ressaltar o fato de que a comparação visual *per se* não é eficaz nesse caso. É de se chamar a atenção o fato de as concentrações iniciais de glicose e xilose variarem em cada análise, embora os meios usados para os cultivos tenham sido feitos usando massas-padrão. Isso deve-se ao fato de que, para cada medição feita no HPLC, o equipamento é calibrado usando uma sequência de soluções com massas de glicose e xilose conhecidas. Para cada “corrida” de amostras no aparelho é necessário preparar uma nova sequência de soluções-padrão; devido à sensibilidade do espectrofotômetro presente em espectrofotômetros de massa, pequenas variações na preparação dessas soluções padrão se refletem em diferenças de medição entre as amostras a serem analisadas, mesmo que elas carreguem uma massa carbônica semelhante entre si. Assim, não se deve comparar os valores obtidos em massa do HPLC, pois os valores obtidos entre si são derivados de calibrações distintas; deve-se comparar as proporções das variações obtidas, uma vez que o que sofre influência das soluções-padrão são os valores de massa absolutos, mas não a proporção de sua variação.

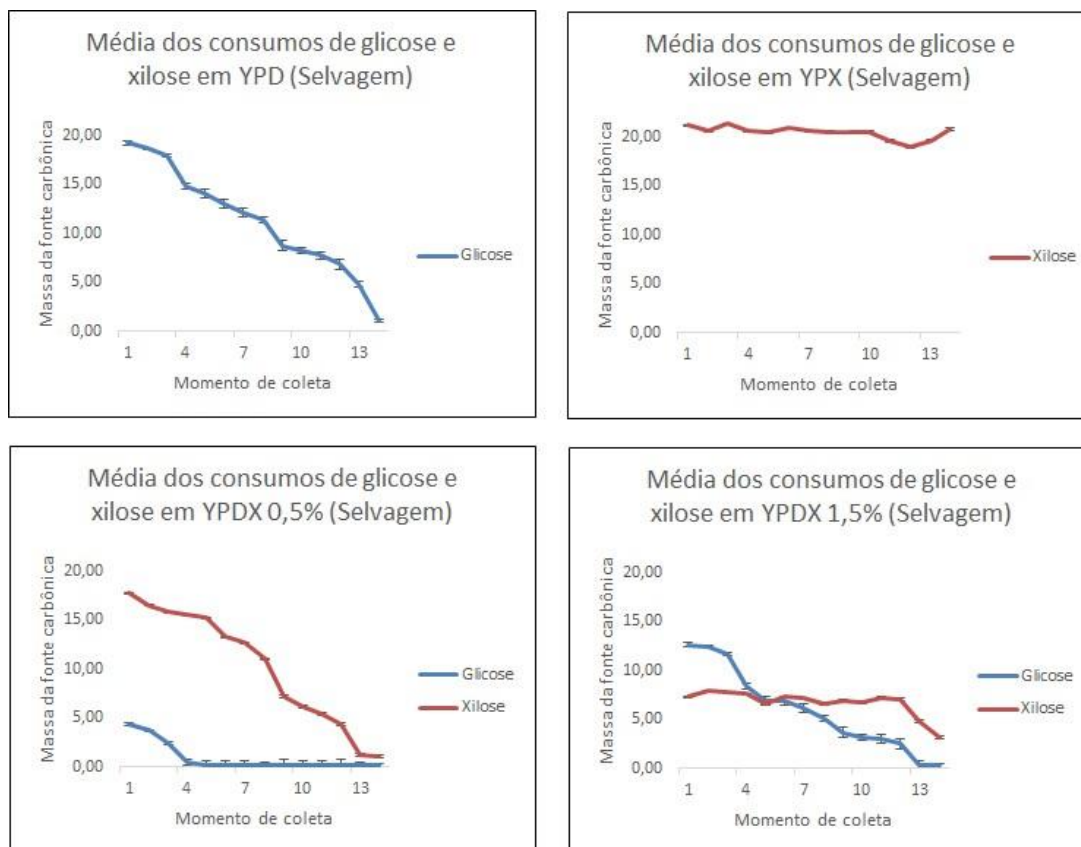
No caso, as proporções foram evidenciadas nos itens da página anterior. Como o objetivo do trabalho foca no consumo de xilose – e as massas de glicose chegam a 0 em torno do ponto 15 ou 5 nas quatro linhagens (nos meios YPD/YPDX 1,5% e YPDX 0,5%), como visto nas **Figuras 20, 22 e 23** – as proporções a ser discutidas são as de variação da pentose.

No meio YPX a Polg nativa apresentou um consumo de 2,12% da massa de xilose no meio, enquanto que as transformantes 1, 2 e 3 apresentaram variações de 14,96%, 17,01% e 31,28%. Por esses valores, fica claro que as transformantes apresentam um melhor desempenho no consumo de xilose. A situação se reflete também nos outros meios com xilose: enquanto a variação da nativa no meio YPDX 0,5% foi de 90,59%, a das transformantes foi de 94,73%, 97,02 e 35,43%, e no meio YPDX 1,5% a nativa apresentou variação de 57,18%, contra 8,22%, 69,19% e 60,86% das transformantes. Observa-se nesses resultados que a transformante 3 apresenta um resultado menor do que suas contrapartes 1 e 2 no meio YPDX 0,5%, e a transformante 1, menor do que 2 e 3 no meio YPDX 1,5%; entretanto, pelas outras duas amostras darem valores muito próximos nos dois casos, elas podem ser interpretadas como desvios derivados por um crescimento inadequado ou mesmo uma contaminação.

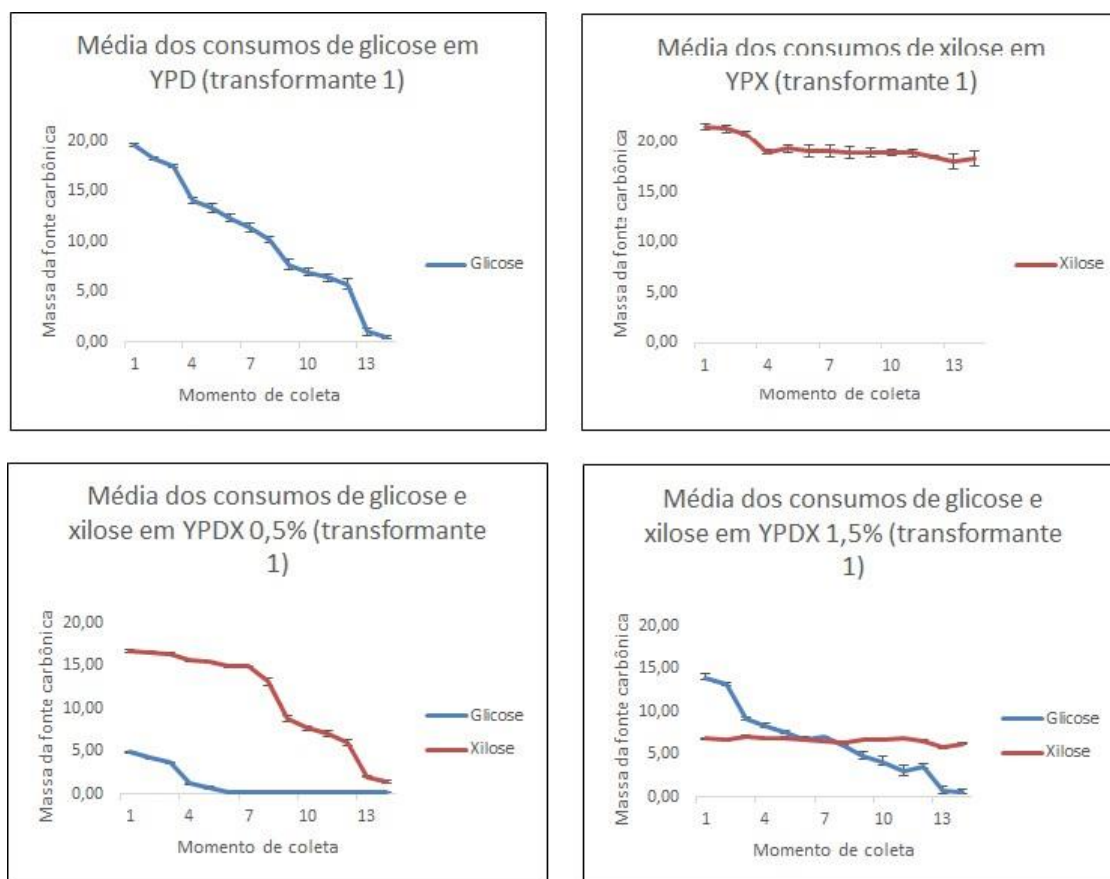
Esses resultados de porcentagem da variação evidenciam que, considerando o consumo de xilose, a inserção do gene *xylA* não apenas promove mudança no fenótipo “consumo de xilose”, mas também gera um fenótipo de consumo da pentose com maior eficiência do que a linhagem nativa original, encarado como o maior sucesso do trabalho desenvolvido ao longo dos últimos dois anos.

Além desse resultado, os gráficos nas **Figuras 16, 17, 18 e 19** permite a elaboração de uma hipótese interessante sobre a fisiologia de *Yarrowia*, relacionada ao consumo de xilose: se observado em todas as figuras citadas, nos gráficos referentes ao consumo nos meios YPDX 0,5% e YPDX 1,5%, é possível notar um comportamento em comum entre todas as linhagens. Esse comportamento é o que a xilose, embora apresente variação em sua concentração ao longo de todo o crescimento das leveduras, é consumida com maior intensidade a partir do momento em que a glicose passa a ser escassa no meio. Isso acontece a partir dos pontos 3-4 e 9-10, respectivamente, nos ditos meios, quando a concentração da hexose se torna menor do que 1g/L, em todos os gráficos. Tal fenômeno já foi descrito para leveduras e outros microrganismos, sendo conhecido como *repressão catabólica por glicose*. Nesse fenômeno, os genes envolvidos em vias metabólicas de carbono são reprimidos pela glicose, evitando que material celular seja mobilizado para a expressão de genes de vias não-glicolíticas, como um mecanismo para garantir economia de energia e material enquanto há o açúcar de seis carbonos no meio (Griffiths et al, 2012). Os resultados apontam uma assimilação de xilose dependente da concentração de xilose no meio, aos moldes da descrição desse fenômeno regulatório; entretanto, embora descrito para diversos grupos bacterianos e de fungos, não se encontrou qualquer bibliografia que apontasse tal fenômeno regulatório especificamente para *Yarrowia lipolytica*. Há a possibilidade de esse trabalho ser o primeiro no qual tal fenômeno tenha sido observado e descrito, mas testes específicos são necessários para que se possa tomar tal conclusão.

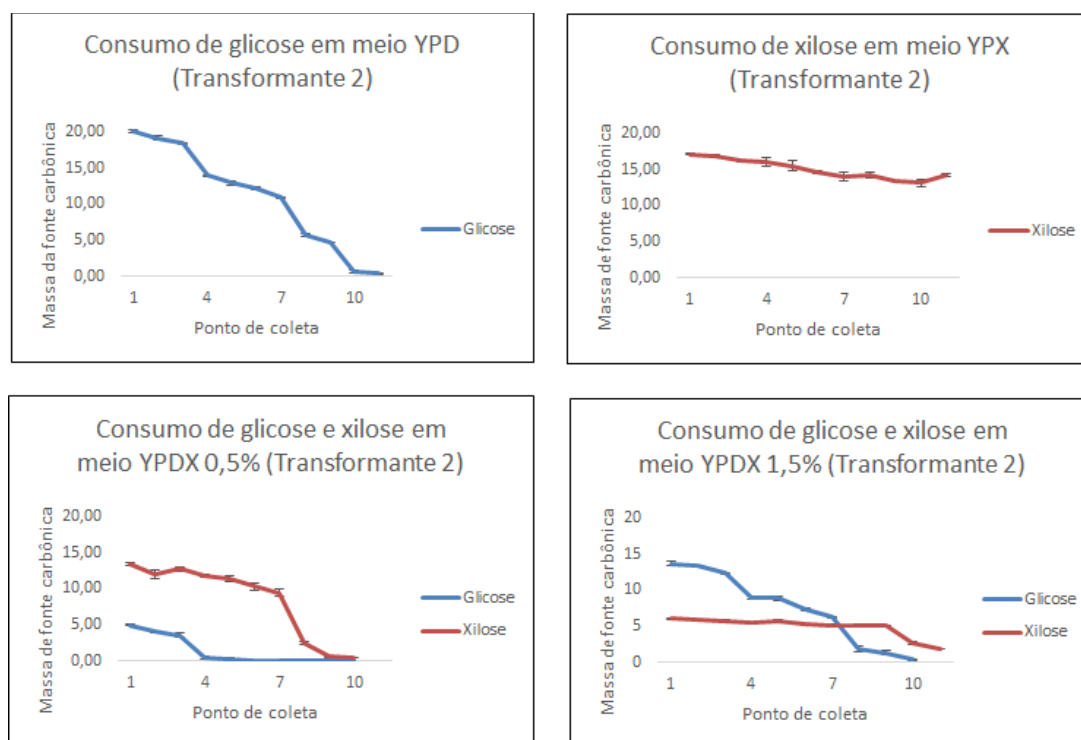
Um último ponto que é preciso ser explicado é que as linhagens nativa e transformante 1 apresentam 14 pontos de observação, enquanto que as transformantes 2 e 3, apenas 11. Isso aconteceu pois, após a observação de que as transformantes 2 e 3 apresentavam comportamento de crescimento similar à transformante 1, se julgou que os últimos pontos poderiam ser eliminados da análise, economizando assim o tempo desse experimento. Como evidenciado pelos resultados descritos, isso não interferiu nas análises fenotípicas.



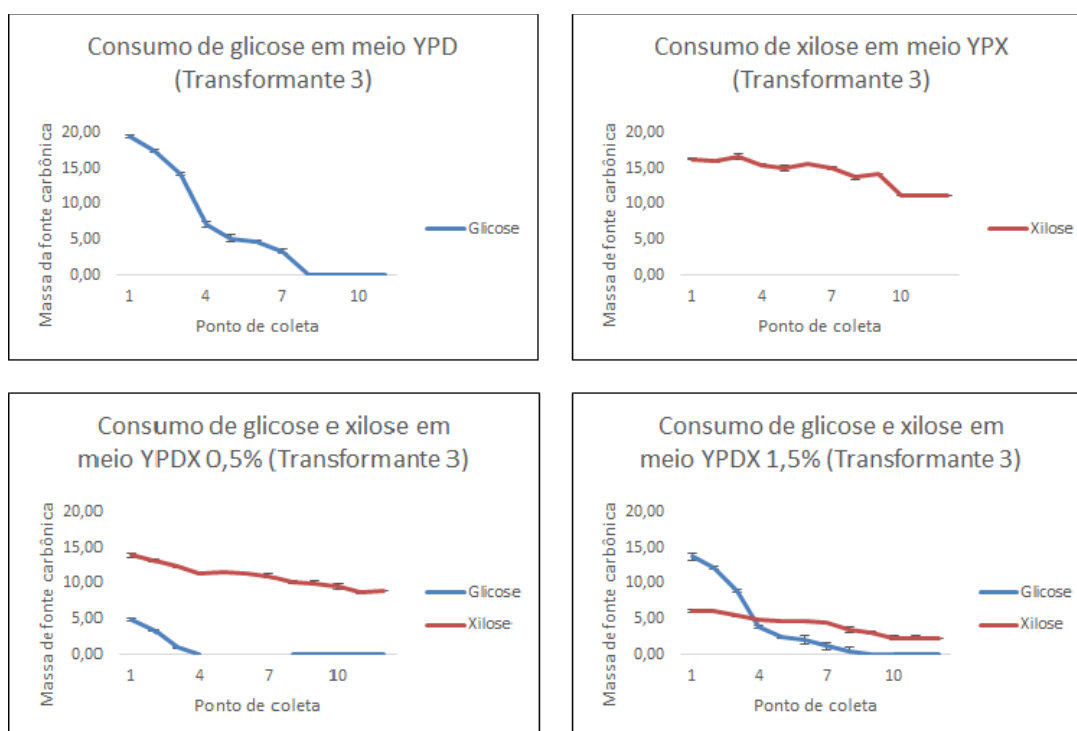
**Figura 16: Gráficos de curva de variação na massa carbônica disponível no meio ao longo do crescimento de *Y. lipolytica* Po1g nativa nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%.** As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. Nos meios que contém glicose é possível notar o consumo constante até a total exaustão do açúcar: ponto 14 para YPD, 4 para YPDX 0,5% e 13 para YPDX 1,5%. Os meios que contém xilose a exaustão da pentose não ocorre, mas uma maior intensidade de seu consumo é perceptível nos meios em que partilham com glicose, principalmente depois que a glicose é exaurida. No meio YPX a concentração de xilose se mantém constante, no meio YPDX 0,5% ela atinge um mínimo de 1,07 g e no meio YPDX 1,5% ela atinge 3,16 g.



**Figura 17:** Gráficos de curva de variação na massa carbônica disponível no meio ao longo do crescimento de *Y. lipolytica* Po1g Transformante 1 nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. Nos meios que contém glicose é possível notar o consumo constante até a total exaustão desse açúcar: ponto 14 para YPD, 6 para YPDX 0,5% e 13 para YPDX 1,5%. Os meios que contém xilose, a exaustão da pentose não é atingida, mas uma maior intensidade de seu consumo é perceptível nos meios em que partilham com glicose, principalmente depois que a glicose é exaurida. No meio YPX a concentração de xilose se mantém quase constante, no meio YPDX 0,5% ela atinge um mínimo de 1,51 g e no meio YPDX 1,5% ela atinge 6,25 g.

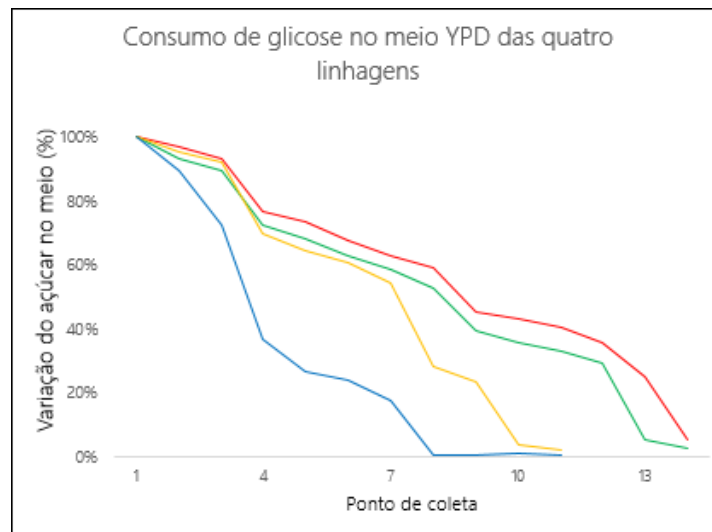


**Figura 18:** Gráficos de curva de variação na massa carbônica disponível no meio ao longo do crescimento de *Y. lipolytica* Po1g Transformante 2 nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. Nos meios que contém glicose é possível notar o consumo constante até a total exaustão desse açúcar: ponto 11 para YPD, 4 para YPDX 0,5% e 10 para YPDX 1,5%. Os meios que contém xilose, a exaustão da pentose não é atingida, mas uma maior intensidade de seu consumo é perceptível nos meios em que partilham com glicose, principalmente depois que a glicose é exaurida. No meio YPX a concentração de xilose se mantém quase constante, no meio YPDX 0,5% ela atinge um mínimo de 0,4 g e no meio YPDX 1,5% ela atinge 1,87 g.

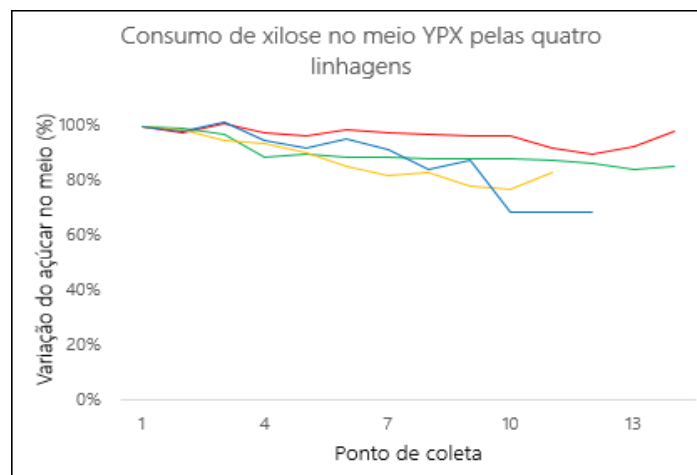


**Figura 19:** Gráficos de curva de variação na massa carbônica disponível no meio ao longo do crescimento de *Y. lipolytica* Po1g Transformante 3 nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados. Nos meios que contém glicose é possível notar o consumo constante até a total exaustão desse açúcar: ponto 8 para YPD, 4 para YPDX 0,5% e 8 para YPDX 1,5%. Os meios que contém xilose, a exaustão da pentose não é atingida, mas uma maior intensidade de seu consumo é perceptível nos meios em que partilham com glicose, principalmente depois que a glicose é exaurida. No meio YPX a concentração de xilose se mantém quase constante, no meio YPDX 0,5% ela atinge um mínimo de 9,0 g e no meio YPDX 1,5% ela atinge 2,38 g.

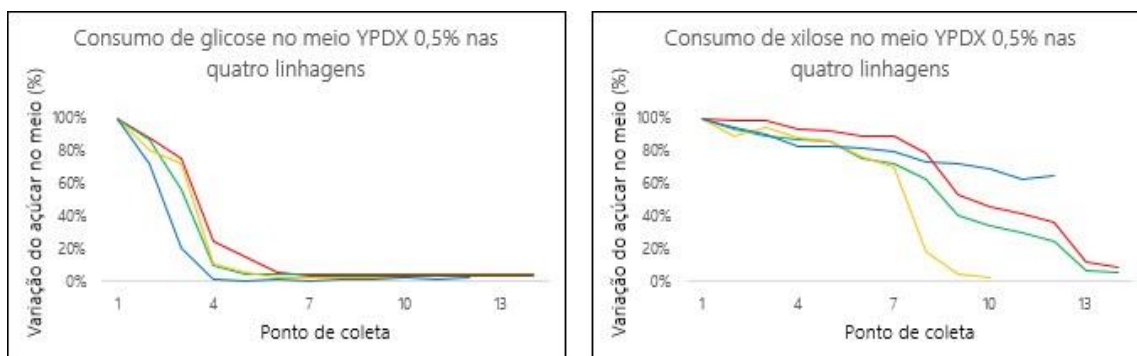
Nas **Figuras 20, 21, 22 e 23** mostra-se a comparação, em um mesmo gráfico, do consumo de glicose e xilose das quatro linhagens (consumo de glicose em meio YPD na **Figura 20**, consumo de xilose em meio YPX na **Figura 21**, consumo de glicose e xilose (em separado) em meio YPDX 0,5 % na **Figura 22**, consumo de glicose e xilose (em separado) no meio YPDX 1,5% na **Figura 23**. Em todos eles a relação mostrada é em porcentagem da variação da concentração de açúcar no meio, facilitando assim as análises comparativas.



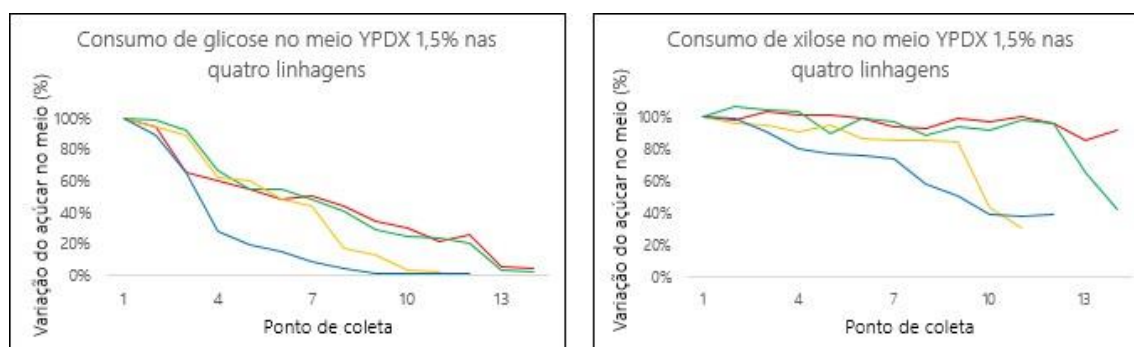
**Figura 20:** Gráfico comparativo com as curvas de consumo de glicose em meio YPD (representada em porcentagem da variação da concentração do açúcar no meio), das quatro linhagens (a nativa e três transformantes). O perfil de consumo, embora constante ao longo do crescimento, é diferente para cada linhagem: a transformante 3 esgota a glicose no ponto 8, a 2 esgota a glicose no ponto 11 e a 1 e a nativa esgotam a glicose no ponto 14. As transformantes 2 e 3 se destacam por seu desempenho altamente eficiente. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.



**Figura 21:** Gráfico comparativo com as curvas de consumo de xilose em meio YPX (representada em porcentagem da variação da concentração do açúcar no meio), das quatro linhagens (a nativa e três transformantes). É possível notar que as linhagens transformantes consomem a xilose, mesmo que pouco, enquanto a nativa consome pouquíssimo da pentose. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.



**Figura 22: Gráfico comparativo com as curvas de consumo de glicose e xilose em meio YPDX 0,5%(representada em porcentagem da variação da concentração do açúcar no meio), das quatro linhagens (a nativa e três transformantes).** Enquanto a glicose é rapidamente consumida até sua exaustão em todos os cultivos, os perfis de consumo de xilose apresentam maior diferença entre as linhagens. A pentose é praticamente esgotada pelas linhagens nativa, transformante 1 e 2, enquanto a transformante 3 apresenta um perfil de consumo de xilose de baixa eficiência. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.



**Figura 23: Gráfico comparativo com as curvas de consumo de glicose e xilose em meio YPDX 1,5%(representada em porcentagem da variação da concentração do açúcar no meio), das quatro linhagens (a nativa e três transformantes).** Enquanto a glicose é consumida até sua exaustão em todos os cultivos, mesmos que a taxas distintas, os perfis de consumo de xilose apresentam maior diferença entre as linhagens. A pentose é consumida com eficiência pelas três transformantes, que exaustam níveis superiores a 50% da concentração original do meio, enquanto a nativa apresenta um perfil de consumo de xilose de baixa eficiência, similar ao perfil em meio YPX. Em vermelho tem-se a linhagem nativa, em verde a transformante 1, em amarelo a transformante 2 e em azul, a transformante 3.



#### 4.7.1) Discussão: o consumo de glicose

Todos os gráficos que retratam consumo de glicose apresentam um perfil de consumo similar (a relação de concentração de açúcar consumido pelo tempo ao longo do tempo), refletindo em inclinações similares entre as quatro linhagens. Naturalmente isso era esperado, uma vez que a maquinaria celular associada à captação de glicose do meio e sua seguinte metabolização permaneceu intocada. É peculiar que os transformantes 2 e 3 aparentemente tenham consumido glicose com maior intensidade do que o transformante 1 e a linhagem nativa(**Figura 20**), mas se pode hipotetizar que isto reflete diferentes estocásticas no processo de crescimento entre experimentos: durante uma etapa do crescimento (entre os pontos 4 e 5), o crescimento dos transformantes 2 e 3 foi mais intenso que o crescimento do clone 1 e do nativa(**Figuras 13, 14 e 15**). Com efeito, é a partir do momento entre os pontos 4 e 5 que os níveis de açúcares começam a se diferenciar com intensidade entre os clones 2/3 e o clone 1 e o controle não transformado (**Figura 20**).

Os dados de consumo de glicose são reprodutíveis entre as quatro linhagens nos meios YPDX 0,5% e YPDX 1,5%, indicando que talvez o grande motivador real dessa aparente diferença na eficiência de consumo de xilose tenha sido causado mais por problemas técnicos do que por uma diferença biológica inata entre as linhagens transformantes, geneticamente idênticas entre si.

#### 4.7.2) Discussão: o consumo de xilose

Quanto ao consumo de xilose, pode-se discernir grandes diferenças entre as leveduras de genótipo nativa (controle não transformado) e os transformantes. O meio YPX se destaca por apresentar grande concentração de xilose, sem qualquer glicose. Nesse meio, não houve consumo de xilose pela linhagem nativa, enquanto o transformante 1 metabolizou 3,2g de xilose, o transformante 2 metabolizou 2,9g/L e o transformante 3, 5,2g (**Tabelas 12, 15, 18 e 21**). Esses dados sugerem fortemente que a transformação de *Yarrowia lipolytica* com o gene *xyIA* levou a um melhoramento no consumo de xilose.

Com relação ao consumo de glicose e xilose em meio YPDX 1,5%, a linhagem nativa também não consome xilose ao longo de todo o crescimento; as linhagens transformantes, por outro lado, consomem xilose a uma taxa constante, porém pequena, ao longo das 10-12 primeiras observações; a partir da observação 11 (transformantes 2 e 3) ou 12

(transformante 1), o consumo de xilose torna-se mais intenso (**Figura 23**). É importante notar que, ao longo desse período, as concentrações de glicose atingem um ponto mínimo.

Uma possível interpretação destes dados, seguindo resultados publicados na literatura, é que o consumo tardio de xilose se deve ao fenômeno de repressão catabólita por parte da glicose. A repressão catabólita acontece quando um gene tem sua regulação controlada pelo produto catabólico de outra reação. A repressão catabólica por glicose, por meio do controle dos níveis de cAMP e CAP, está envolvida no controle de expressão de diversos genes de vias de metabolismo de açúcares em procariotos e eucariotos (Griffiths, 2012; Rojo, 2001). Hipotetizamos que o promotor utilizado em nossas construções (promotor hp4d) sofre esse tipo de regulação, uma vez que é derivado de manipulações do promotor XPR2 (pXPR2), responsável pela expressão da enzima protease alcalina celular, uma das enzimas mais expressas nessa espécie (Ogrydziak et al., 1977), relacionada à aquisição de carbono a partir de substratos extracelulares.

#### 4.8) Testes fenotípicos: produção de lipídeos

A análise da produção de lipídeos foi realizada nos meios utilizados nos testes descritos anteriormente (YPD, YPX, YPD<sub>X</sub> 0,5% e YPD<sub>X</sub> 1,5%) e também em meios cuja proporção carbono/nitrogênio induz a síntese de compostos hidrofóbicos (YnPD, YnPX, YnPD<sub>X</sub> 0,5% e YnPD<sub>X</sub> 1,5%, cuja composição está descrita em material e métodos), com as quatro linhagens (nativa, transformante 1, transformante 2 e transformante 3). Em um segundo momento, após verificar a reprodutibilidade dos resultados entre os clones transformantes, foi escolhido um deles para a realização de um experimento mais extensivo, com mais replicatas técnicas durante a extração, utilizando os dois meios mais relevantes para a análise do fenótipo “produção de lipídeos em meio contendo xilose”. Como poderá ser observado abaixo, a linhagem escolhida foi o transformante 3, e os meios escolhidos foram os que apresentavam maiores níveis em massa de xilose: YPX, YPD<sub>X</sub> 0,5%, YnPX e YnPD<sub>X</sub> 0,5%, com seis replicatas para cada linhagem em cada meio de cultura, sempre em comparação com o controle de genótipo nativa (não transformado).

A **Tabela 26** apresenta a massa de lipídeo e massa seca total extraídas do crescimento em 120 horas (cinco dias) da *Y. lipolytica* Po1g nativa nos meios contendo níveis padrão de peptona e extrato de levedura, em conjunto com as porcentagens de lipídeos em relação à massa seca e seus desvios e erros padrões; a **Tabela 27** apresenta as massas de

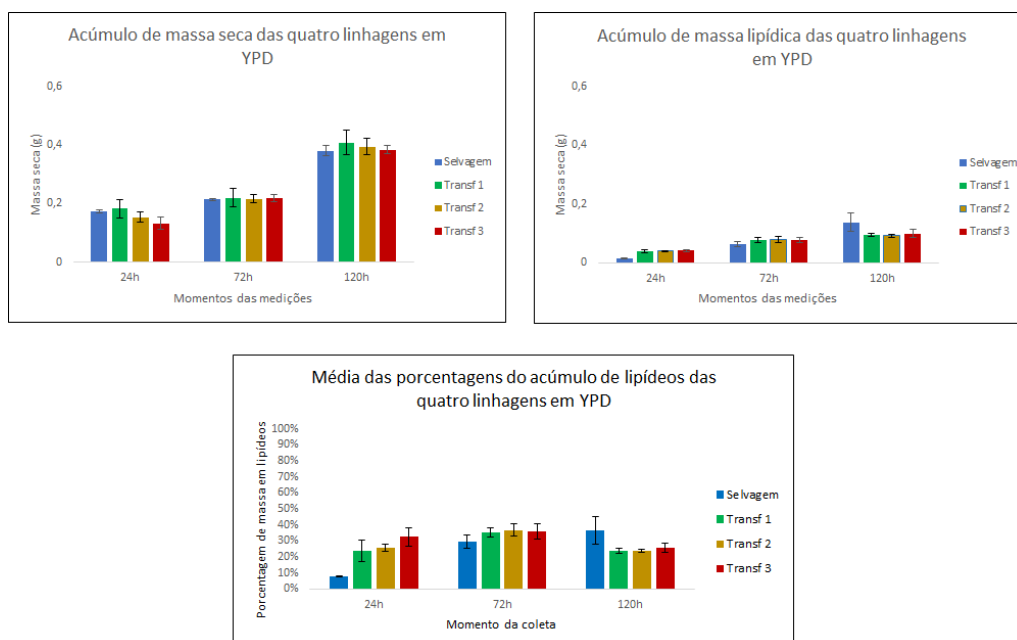
lipídeo e seca total extraídas do crescimento em 120 horas da Po1g transformante 1 nos meios contendo níveis padrão de peptona e extrato de levedura, em conjunto com as porcentagens lipídicas em relação às massas secas e seus desvios e erros-padrões. Os mesmos dados para as transformantes 2 e 3 estão nas **Tabelas 28 e 29**, respectivamente. A **Figura 24** apresenta gráficos de barra com informações de produção de lipídeos, produção de massa seca e porcentagem de lipídeos em relação à massa seca das quatro linhagens, ao longo das 120 horas de crescimento no meio YPD; a **Figura 25** traz os mesmos tipos de dados, para crescimento em meio YPX; a **Figura 26**, para meio YPDX 0,5% e a **Figura 27**, para meio YPDX 1,5%.

Na **Figura 24** (crescimento em YPD) é possível notar que, ao longo de todas as 120 horas de crescimento, o acúmulo de massa seca entre as quatro linhagens (nativa e transformantes 1, 2 e 3) é extremamente similar entre todos, atingindo um máximo em torno de 0,4 g/L. O acúmulo de massa lipídica tem o mesmo comportamento, com todas as amostras produzindo massas similares, mas com a nativa apresentando um atraso de acúmulo na primeira medição (cerca de 60% a menos do que as transformantes) e um boost maior na última medição, acumulando cerca de 40% a mais de lipídeos do que as transformantes. Como consequência, tem-se nos gráficos de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca uma constância de valores entre as transformantes, mas com a nativa começando com uma porcentagem menor em 24h, alcançando as transformantes em 72h e ultrapassando-as em 120h.

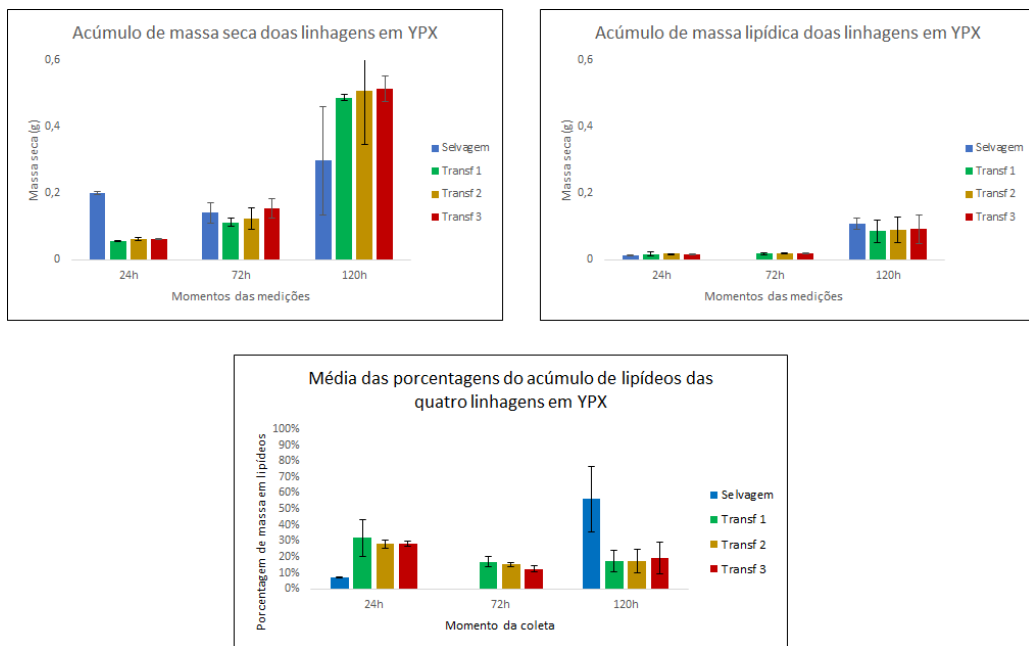
Na **Figura 25** (crescimento em YPX) observa-se que a linhagem nativa começa com um grande acúmulo de massa seca nas primeiras 24h, e esse acúmulo se mantém constante ao longo das próximas 120h; enquanto isso, as transformantes apresentam pouca massa seca no primeiro ponto, mas dobrando essa massa em 72h e atingindo uma grande quantidade de matéria seca em 120h, ultrapassando a nativa, quase quadruplicando seu número. Enquanto isso, o acúmulo de lipídeos entre as três linhagens se mantém constante ao longo dos três pontos de crescimento, com uma pequena massa. Isso tudo reflete no gráfico de porcentagem lipídica: inicialmente tem-se que a nativa acumula poucos lipídeos em um primeiro ponto em relação às transformantes, graças ao seu grande acúmulo de massa seca inicial; como a massa seca dela se mantém constante enquanto ela acumula lipídeos, sua porcentagem aumenta gradualmente. Com as transformantes ocorre o contrário: como elas

acumulam pouca massa seca inicialmente sua porcentagem é maior, mas ela cai ao longo do crescimento graças ao seu intenso acúmulo de massa seca.

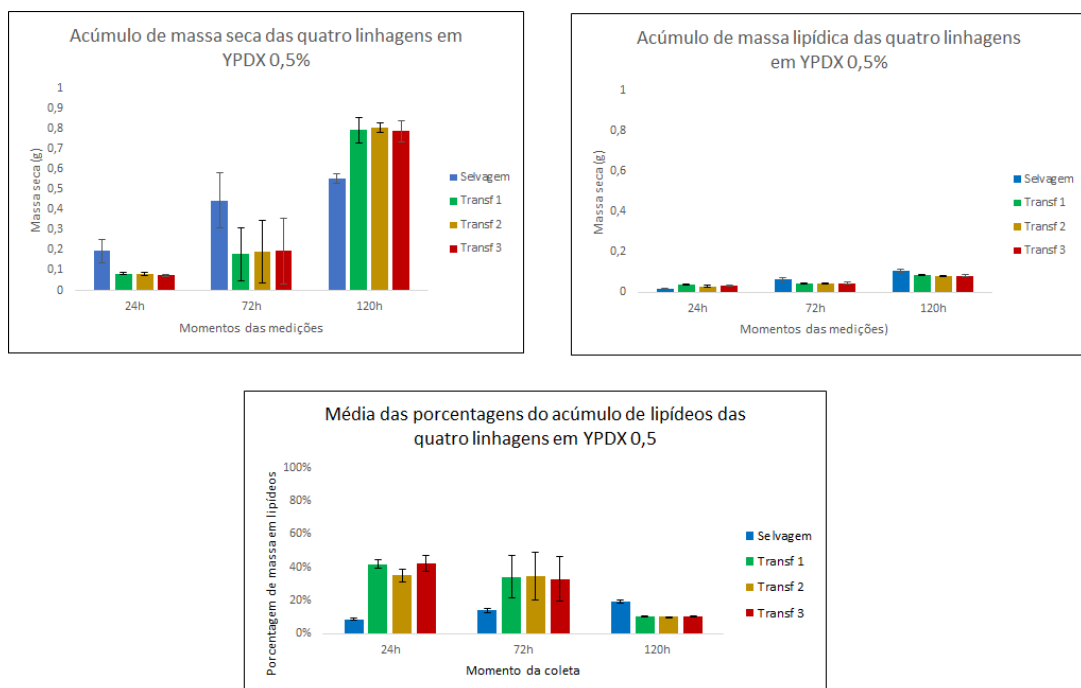
É interessante observar que a descrição da **Figura 26** (crescimento em YPD 0,5%) é praticamente a mesma da **Figura 25**. Todas as amostras e linhagens apresentam exatamente o mesmo comportamento da série de gráficos anterior, tanto em proporções quanto em valores. O mesmo é válido para a **Figura 28** (crescimento em YPD 1,5%), mas as proporções das barras e os valores são ligeiramente diferentes das duas anteriores, com menor acúmulo de massa seca e maior acúmulo de massa lipídica. Nesse há uma maior proximidade de valores de acúmulo de massa seca entre a nativa e as transformantes, com a transformante 1 despontando como maior acúmulo de massa seca. Enquanto os valores de acúmulo de massa lipídica são extremamente semelhantes entre todas as amostras nos três pontos, a diferença nas massas secas acumuladas se reflete no gráfico de porcentagem de lipídeos. Como a transformante 1 acumula maior massa seca, suas porcentagens são menores; as transformantes 2 e 3 e a nativa apresentam valores próximos em 24h e 72h, mas a porcentagem de lipídeos da nativa desponta em 120h graças a uma queda na massa seca dessa linhagem nesse ponto de crescimento.



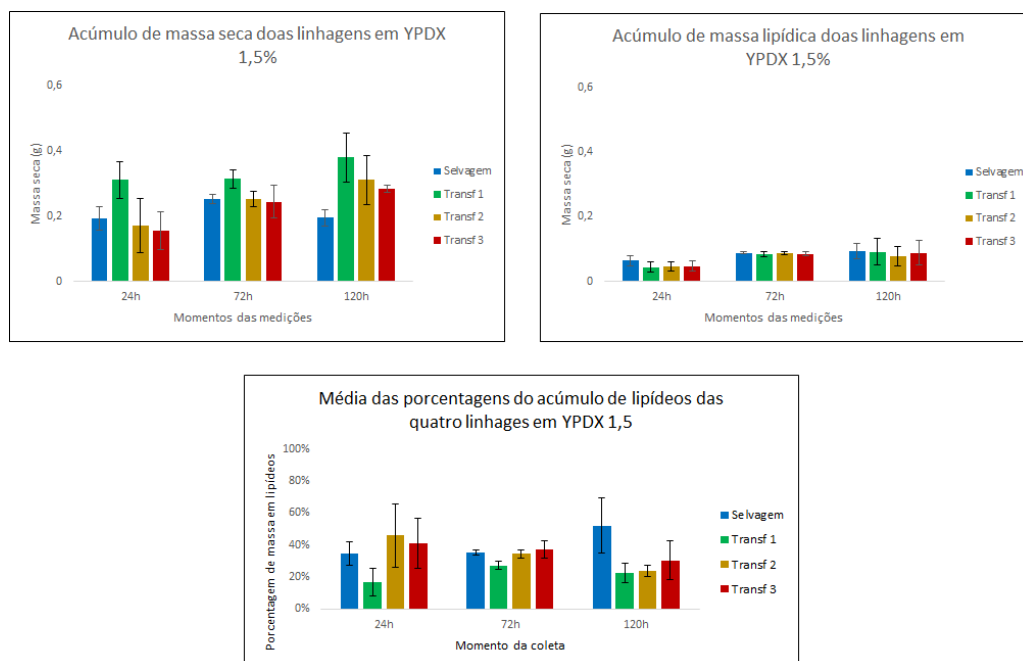
**Figura 24:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h das quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YPD. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.



**Figura 25:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h das as quatro linhagens *Y. lipolytica* Po1g no meio YPX. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.



**Figura 26:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h para as quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YPDX 0,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.



**Figura 27:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h para as quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YPD 1,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.

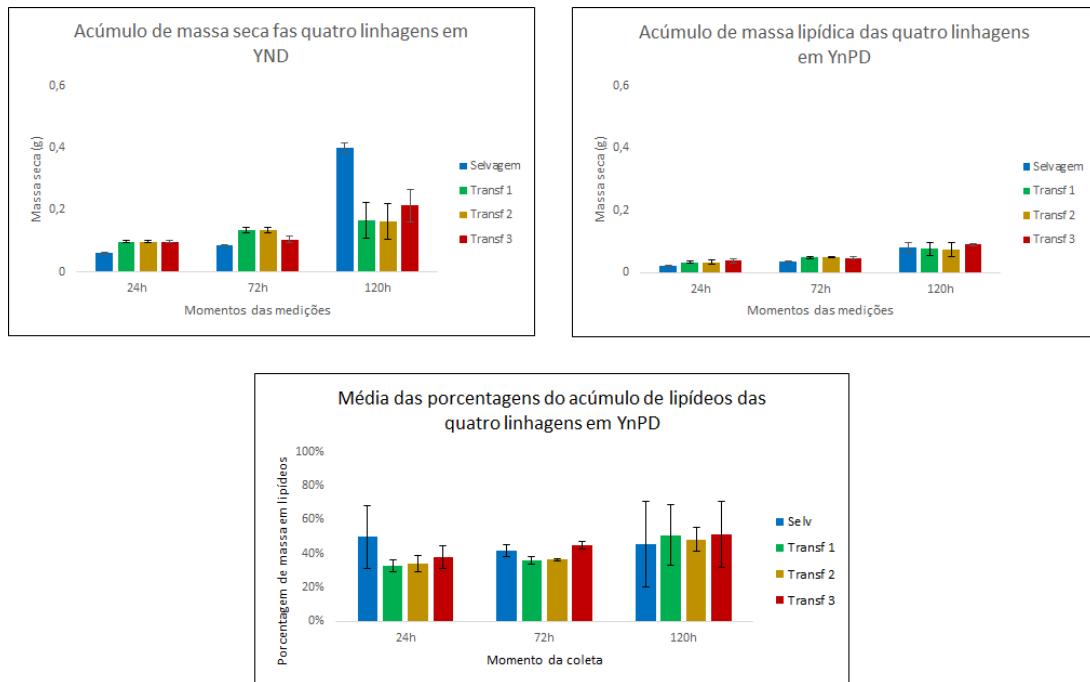
De modo análogo, a **Tabela 30** apresenta as massas de lipídeo e seca total extraídas do crescimento em 120 horas da *Y. lipolytica* Po1g nativa, mas nos meios YnPD, YnPX, YnPDX 0,5% e YnPDX 1,5%, em conjunto com as porcentagens lipídicas e seus desvios e erros padrões; as **Tabelas 31, 32 e 33** apresentam os mesmos dados, mas para os transformantes 1, 2 e 3. As **Figuras 28, 29, 30 e 31** apresentam tais dados em forma de gráficos.

Na **Figura 28** (crescimento em YnPD) é possível notar que nos pontos de 24h e 72h o acúmulo de massa seca entre as transformantes 1, 2 e 3 é extremamente similar entre todos, mas no último ponto a transformante 3 cresce ligeiramente mais do que as outras duas a nativa, por outro lado, se mantém com uma massa pequena – cerca de metade da massa acumulada pelas transformantes – mas praticamente quadruplica sua massa em 120h, ultrapassando todas as transformantes em mais que o dobro. O acúmulo de massa lipídica tem comportamento diferente, com todas as amostras produzindo massas praticamente idênticas. No gráfico de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ocorre uma constância de valores entre as transformantes, mas com a nativa começando com uma porcentagem maior em 24h, se igualando as transformantes em 72h e mantendo esse valor em 120h.

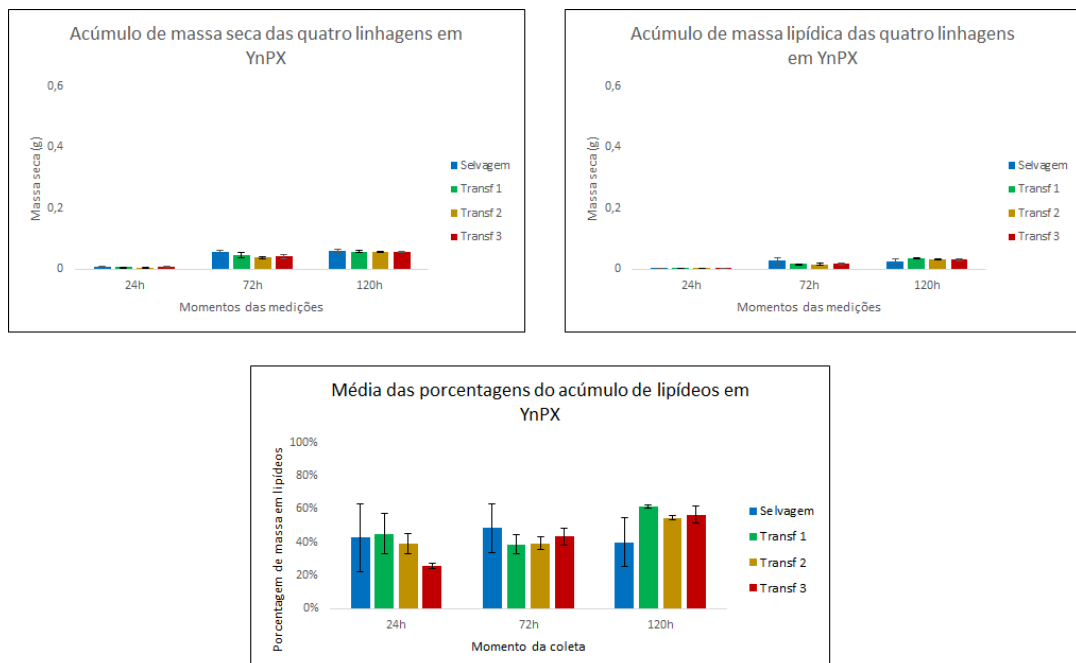
Na **Figura 29** (crescimento em YnPX) que todas as linhagens têm valores extremamente similares de acúmulo de massa seca ao longo dos três pontos. As diferenças ocorrem no acúmulo de lipídeos: todas começam com valores similares, mas a nativa tem um acúmulo ligeiramente maior do que as transformantes em 72h, com o quadro se invertendo em 120h. Como consequência, tem-se que os valores iniciais de porcentagem de lipídeos são similares entre todas (com exceção da transformante 3), seguindo para um pico maior da nativa em 72h, terminando com o maior acúmulo das transformantes em 120h.

Na **Figura 30** (crescimento em YnPDX 0,5%) tem-se que o acúmulo de massa seca é extremamente similar nos pontos 24h e 72h, mas a nativa desponta com maior acúmulo de massa seca em relação às transformantes em 120h, com cerca de 30% a mais. A mesma situação acontece para o acúmulo de lipídeos: embora idêntico entre os dois primeiros pontos, o nível de acúmulo de lipídeos da nativa aumenta consideravelmente em 120h. Entretanto, como as taxas de aumento foram mantidas nas três linhagens nos três pontos, todo o gráfico referente à porcentagem de lipídeos apresenta valores idênticos entre todas as linhagens nos três pontos.

A **Figura 31** (crescimento em YnPDX 1,5%) tem um comportamento diferente das três descritas anteriormente: nela, inicialmente a nativa começa com maior acúmulo de massa seca, com o dobro de massa em relação às transformantes em 24h, mas com as transformantes ultrapassando a nativa e acumulando o dobro de massa em relação à essa última em 72h. Na medição de 120h a nativa “alcança” as transformantes, registrando o mesmo valor em massa seca que as transformantes. No que diz respeito às massas lipídicas, ocorre exatamente o mesmo que ocorre nas massas secas: inicialmente a nativa acumula mais lipídeos, mas as transformantes a ultrapassam em 72h, e todas terminam com uma massa lipídica aproximadamente igual ao fim das 120h. O gráfico de porcentagem de lipídeos registra que, inicialmente, a porcentagem da nativa é menor que a das transformantes (em consequência de seu maior acúmulo de massa seca inicial), mas a nativa as ultrapassa em 72h (devido ao acúmulo de massa seca maior dessas três linhagens nesse mesmo ponto). Por fim, todas se estabilizam no mesmo valor de porcentagem de lipídeos, em 120h.

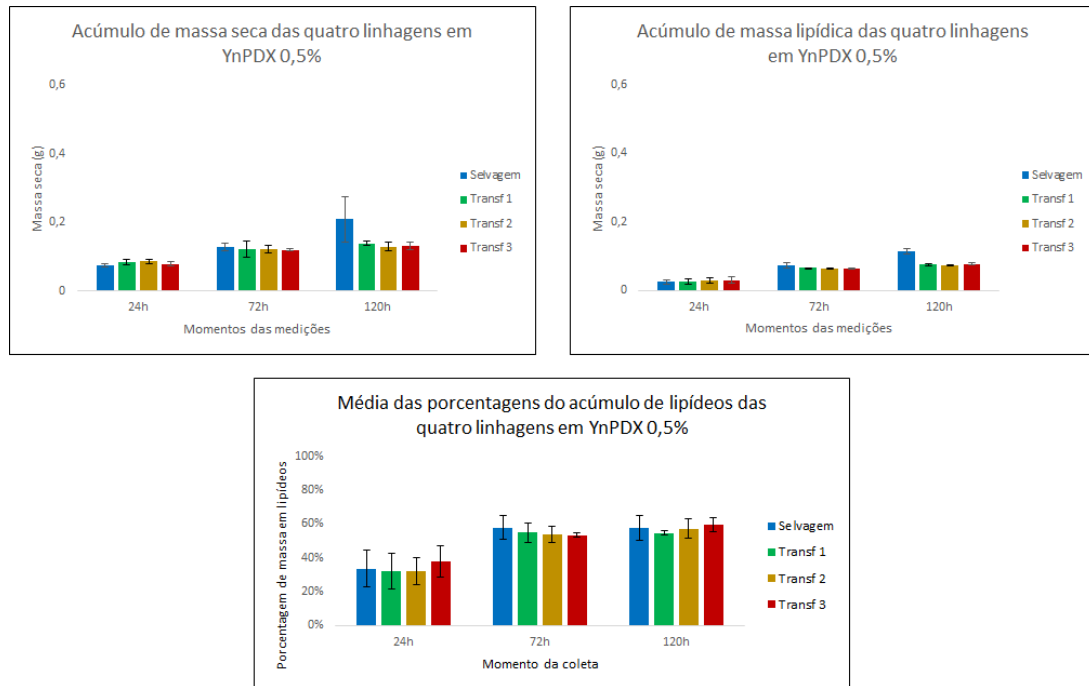


**Figura 28:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h para as quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YnPD. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.

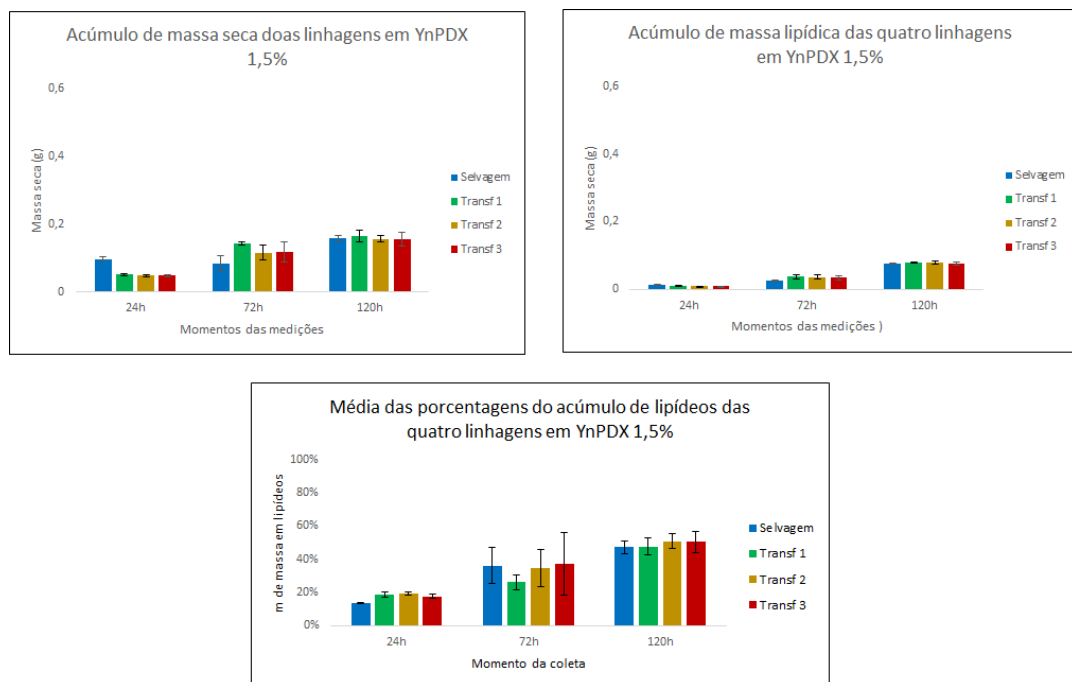


**Figura 29:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h para as quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YnPX. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.





**Figura 30:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h para as quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YnPDX 0,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.

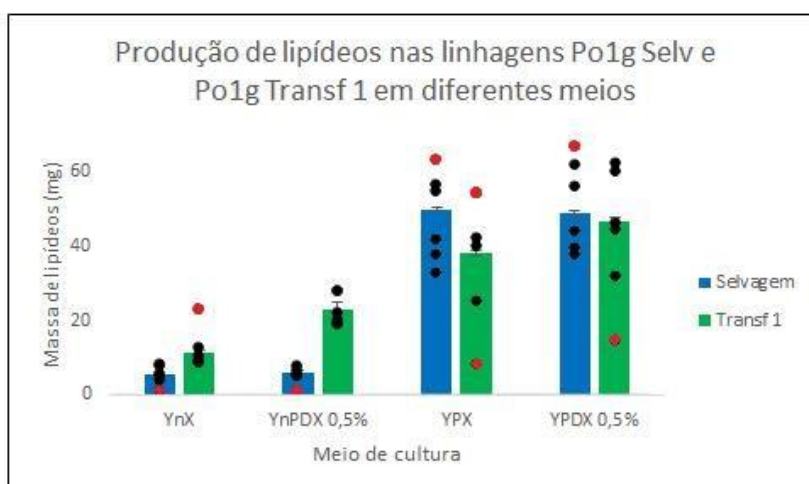


**Figura 31:** Gráficos de produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca ao longo do crescimento de 120h para as quatro linhagens de *Y. lipolytica* Po1g no meio YnPDX 0,5%. As barras de erro padrão estão postas em todos os pontos coletados.

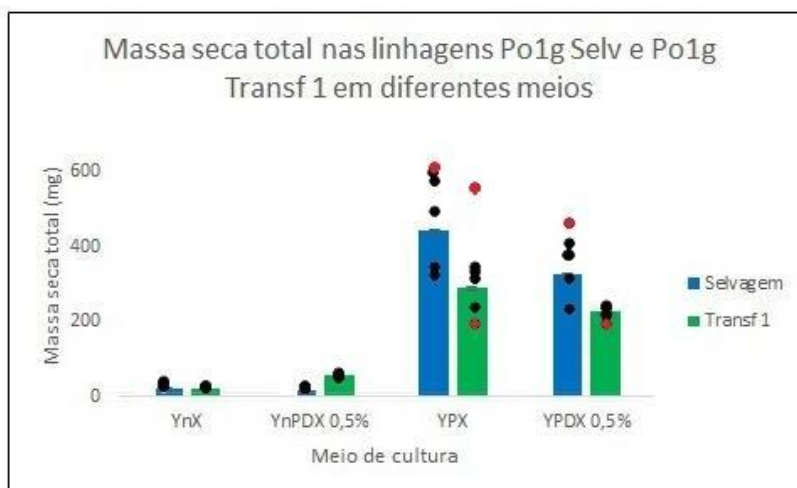
Os resultados obtidos nos crescimentos em meios com xilose apresentaram alta variância entre as amostras e replicatas técnicas, levando a elevados erros-padrão, impossibilitando sua utilização em nossas análises. A solução apontada foi aumentar o número de replicatas, o que possibilitaria a exclusão de eventuais *outliers* enquanto se mantinha a robustez e reprodutibilidade dos resultados. Estas análises mais refinadas foram realizadas com apenas um transformante e com meios contendo xilose (YPX, YPDX 0,5%, YnPX e YnPDx 0,5%), onde se pode avaliar a produção de lipídeos no contexto de consumo de xilose, o objetivo central deste trabalho de dissertação.

Desse modo, foi realizado experimento para analisar a produção de lipídeos, de massa seca total e de porcentagem de massa de lipídeos em relação à massa seca, utilizando as linhagens Po1g Nativa e Po1g Transformante 1, nos meios YPX, YnPX, YPDX 0,5% e YnPDx 0,5% durante 120 horas, utilizando seis replicatas para cada um desses casos. A **Tabela 34** traz os resultados obtidos de produção de lipídeos, massa seca total e porcentagem de lipídeos em relação à massa seca para a linhagem nativa, assim como a **Tabela 35** para a levedura Po1g Transformante 1, e a **Figura 32** traz o gráfico referente à produção de lipídeos, a **Figura 33** o gráfico referente ao acúmulo de massa seca total e a **Figura 34** o gráfico referente à porcentagem de lipídeos em relação à massa seca.

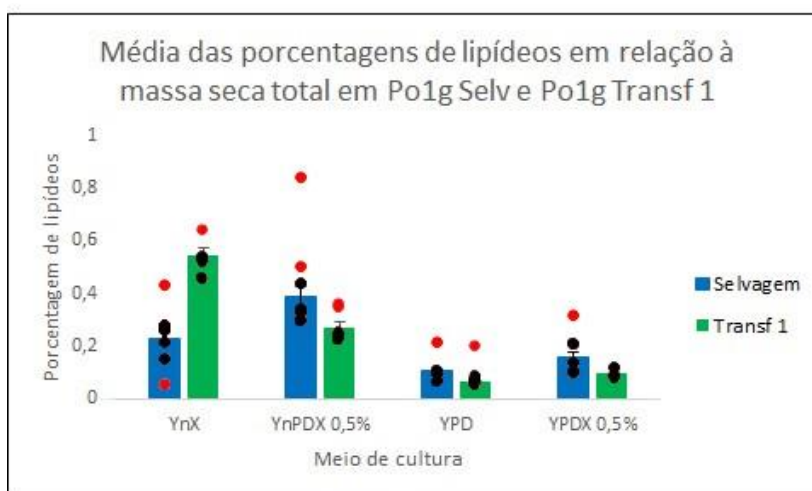
É importante ressaltar que, para estas análises, os valores de replicatas discrepantes (*outliers*) foram eliminados após análise da variância e da dispersão dos dados entre as numerosas replicatas produzidas. Nos gráficos das **Figuras 32, 33 e 34**, a média das barras representa as médias entre valores após eliminação de possíveis *outliers*, embora todos os pontos individuais (inclusive os *outliers* eliminados) sejam apresentados em forma de pontos sobre os gráficos. Os valores eliminados estão apontados nas legendas das figuras. O critério seguido foi a distância do valor do dado em relação à média.



**Figura 32: Gráfico de produção de lipídeos (mg) após crescimento de 120h para as linhagens *Y. lipolytica* Po1g Nativa e Transformante 1 nos meios YPX, YPDX 0,5%, YnPX e YnPDX 0,5%.** As replicatas eliminadas são as seguintes: 4 e 5 para YnPX Selv, 3 para YnPDX 0,5% Selv, 2 e 5 para YPX Selv, 3 para YPDX 0,5% Selv, 5 para YnPX Tranf 1, 1 para YnPDX 0,5% Transf 1, 6 para YPX Transf 1 e 1 para YPDX 0,5% Transf 1, estando indicados em vermelho nos gráficos. Os pontos indicam os valores das amostras que foram usadas para fazer as colunas.



**Figura 33: Gráfico de massa seca total extraída (mg) após crescimento de 120h para as linhagens *Y. lipolytica* Po1g Nativa e Transformante 1 nos meios YPX, YPDX 0,5%, YnPX e YnPDX 0,5%.** As replicatas eliminadas são as seguintes: 4 e 5 para YnPX Selv, 3 para YnPDX 0,5% Selv, 2 e 5 para YPX Selv, 3 para YPDX 0,5% Selv, 5 para YnPX Tranf 1, 1 para YnPDX 0,5% Transf 1, 6 para YPX Transf 1 e 1 para YPDX 0,5% Transf 1, estando indicados em vermelho nos gráficos. Os pontos indicam os valores das amostras que foram usadas para fazer as colunas.



**Figura 34: Gráfico de porcentagem de lipídeos em relação à massa seca após crescimento de 120h para as linhagens *Y. lipolytica* Po1g Nativa e Transformante 1 nos meios YPX, YPD 0,5%, YnPDX e YnPDX 0,5%.** As replicatas eliminadas são as seguintes: 4 e 5 para YnPDX Selv, 3 para YnPDX 0,5% Selv, 2 e 5 para YPX Selv, 3 para YPD 0,5% Selv, 5 para YnPDX Transf 1, 1 para YnPDX 0,5% Transf 1, 6 para YPX Transf 1 e 1 para YPD 0,5% Transf 1, estando indicados em vermelho nos gráficos. Os pontos indicam os valores das amostras que foram usadas para fazer as colunas.

Avaliando os gráficos é possível notar alguns pontos:

- **A produção de lipídeos é significativamente menor nos meios YnP do que nos meios YP.** Na Figura 32 é indicado que a produção de lipídeos da linhagem nativa no meio YnPDX é 5,2 mg e a da linhagem transformante é 13,6 mg. Enquanto isso, no meio YPX, tem-se 47,9 mg para a nativa e 41,5 mg para a transformante, um aumento de cerca de dez vezes para a nativa e três vezes para a transformante. Nos meios YnPDX 0,5% e YPD 0,5% também ocorre aumento, mas com proporções diferentes: a nativa alcança 6,8 mg no primeiro e 51 mg no segundo, e a transformante elencando 24,1 mg no primeiro e 47,4 no segundo.
- **A diferença da produção de lipídeos entre a nativa e a transformante é intensificada nos meios YnP, enquanto que nos meios YP quase não há diferença entre as duas linhagens.** De modo interessante, nos meios YP a nativa acumula mais lipídeos que a transformante, apesar de ser uma pequena diferença entre elas.

- **Há um acúmulo de massa seca significativamente maior nos meios YP, quando comparado com os meios YnP.** A levedura nativa acumula 22 mg e 15,1 mg nos meios YnPX e YnPDX 0,5%, enquanto que nos meios YPX e YPDX 0,5% ela alcança os números de 432,2 mg e 303 mg, cerca de 20 vezes mais massa. A transformante acumula 20,9 mg e 84,7 mg nos meios com pouca peptona e extrato de levedura, contra 288,8 mg e 229,6 mg nos meios com maior quantidade desses compostos.
- **A linhagem nativa é mais competente em acumular massa seca do que a transformante, nos meios ricos em fonte de nitrogênio. Entretanto, no meio YnPDX 0,5%, a situação se inverte.**
- **A linhagem nativa apresenta uma porcentagem de lipídeos em relação à massa seca maior que a transformante nos meios YnPDX 0,5%, YPX e YPDX 0,5%.** Entretanto, nos meios YPX e YPDX 0,5% a diferença de acúmulo entre as duas linhagens não é significativa. No meio YnPDX 0,5% a diferença é considerável, mas ela deriva do baixíssimo acúmulo de massa seca que a nativa apresenta nesse meio, e não de uma grande produção lipídica, uma vez que a transformante acumula muito mais massa seca e lipídeos do que ela. No meio YnPX a transformante tem tanto maior produção de lipídeos quanto de massa seca e maior porcentagem de massa de lipídeos em relação à massa seca do que a nativa.

Com base nesses dados, propomos as seguintes interpretações sobre as diferenças no metabolismo de pentoses e de síntese de lipídeos nas comparações entre as linhagens nativa e transformantes:

#### **4.8.1) Discussão: as similaridades e diferenças na síntese de lipídeos entre a Po1g Nativa e as Po1g Transformantes**

Como observado nas **Figuras 24 – 31**, os dados de produção de lipídeos, massa seca total e porcentagem de lipídeos são reprodutíveis entre os três transformantes utilizados ao longo do experimento. No que tange ao acúmulo de lipídeos, é possível observar nas **Figuras 24 – 31** que, não importado o meio, a massa de lipídeos acumulada é extremamente similar entre a linhagem nativa e as linhagens transformantes. Tal fato não é de se surpreender, ao considerarmos que a maquinaria genética e celular que condiciona a síntese

de lipídeos não foi alterada nos transformantes. É importante também ressaltar que *Yarrowia lipolytica* apresenta uma maquinaria celular extremamente diversa no que diz respeito a capacidade de assimilar cadeias carbônicas em diferentes substratos, sejam eles derivados de açúcares, ou com origem em compostos nitrogenados, como peptídeos e aminoácidos (Kurtzman, Fell e Boekhout, 2011); assim, nos meios complexos contendo níveis-padrão de peptona e extrato de levedura (YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%), é possível que os valores de acúmulo de lipídeos das linhagens nativa e transformantes sejam similares uma vez que tenham se originado da assimilação de diferentes fontes carbônicas, não necessariamente xilose.

Nesse contexto, é importante considerar a comparação de produção de lipídeos entre nativa e transformante 1 no crescimento com seis replicatas, ao longo de 120 horas (**Figura 33**). Pode-se observar, neste caso, a influência da presença de peptona e extrato de leveduras (em teoria, fontes carbônicas diversas capazes de serem assimiladas por *Y. lipolytica*): nos meios contendo esses compostos – YPX e YPDX 0,5% - os níveis de acúmulo de lipídeos foram próximos entre a linhagem nativa e a linhagem transformante; já nos meios que apresentavam a concentração 100x menor dos referidos reagentes – YnPX e YnPDX 0,5% - a diferença entre a síntese de lipídeos entre as linhagens foi mais evidenciada. Na mesma linha, Oliveira (2014) observou que o acúmulo de lipídeos é fortemente influenciado por compostos que suplementam a presença de carboidrato no meio de crescimento de *Yarrowia lipolytica*. Como apontado por Madigan em 2010, meios complexos permitem o crescimento de diversas espécies de microrganismos por serem ricos em micronutrientes, macronutrientes e fatores de crescimento/vitaminas, que são os suplementos da fonte de carbono dos meios de cultura. Os meios YP(D/X) e YnP(D/X) usados no trabalho se enquadram nessa classe de meios de cultura. É possível que a linhagem nativa crescendo em YPX e YPDX 0,5% tenham apresentado níveis altos de acúmulos de lipídeos não por estarem consumindo a xilose, mas sim por usar as cadeias carbônicas de origem protéica presentes na peptona e extrato de levedura enquanto o crescimento se manteria estimulado pela presença dos citados suplementos. Essa mesma hipótese explica porque o acúmulo de lipídeos entre transformante e nativa se acentua nos meios YnP, a favor do transformante: concentrações de peptona e extrato de levedura 100x menor do que as presentes no outro meio significam 100x menos carbono vindo de fontes que não os açúcares e também 100x menos suplementação por outros compostos, permitindo que o fenótipo de interesse seja melhor analisado.

É relevante notar que, nos meios contendo peptona e xilose, a produção de lipídeos pela linhagem nativa supera ligeiramente a produção de lipídeos pelas transformantes, apesar dos altos níveis de xilose no meio de cultivo em questão (**Figura 33**, YPX e YPDX 0,5%), o que permite concluir que a levedura nativa está, de algum modo, compensando sua incapacidade de assimilar xilose com outras vias bioquímicas. Como as mesmas vias estão presentes na levedura transformante, é de se esperar que esse acúmulo seja similar nas duas linhagens. Entretanto, quando há pouca peptona ou extrato de levedura, a linhagem transformante apresenta maior acúmulo de lipídeo em meio contendo alto nível de xilose, como esperado pela hipótese central deste trabalho de tese. Desta forma, pode-se concluir que a otimização do *codon usage* apresentou sucesso em *Yarrowia lipolytica* para a expressão do gene *XylA*, em concordância com resultados similares de outros trabalhos (Kaishima et al., 2015, Gustafsson et al., 2004 e Sheff & Thorn, 2004) onde tal técnica teve sucesso na manipulação genética para expressão heteróloga de proteínas em leveduras.

#### **4.8.2) Discussão: as similaridades e diferenças na produção de massa seca total entre Po1g Nativa e Po1g Transformantes**

Outra comparação que permite inferir conclusões sobre as diferenças de assimilação de carboidratos entre as linhagens nativa e transformante é em relação à massa seca total produzida. Nos meios com xilose, observamos, via de regra, que as linhagens transformantes acumulam massa seca maior que a nativa (em torno de 30% a mais), após crescimento de 120h, com a diferenciação de acúmulo se iniciando após 72h de crescimento (**Figuras 24, 25, 26 e 27** – referentes ao crescimento das linhagens em YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5%). A situação muda apenas quando há a presença de glicose no meio (**Figura 24**): a massa seca total obtida é muito próxima entre as três linhagens estudadas. Isso sugere que a xilose está sendo utilizada diferencialmente nas linhagens, permitindo afirmar que as linhagens transformantes têm um desempenho de crescimento superior ao da nativa em um meio com elevada concentração dessa pentose.

É curioso notar que a linhagem nativa tende a possuir um acúmulo inicial de massa seca superior ao das transformantes, nas primeiras 24h de crescimento, em todos os meios. Por um lado, esse fato parece contradizer a afirmação de que as linhagens transformantes têm melhor desempenho na presença de xilose; por outro, Oliveira (2014) levanta a hipótese de que *Yarrowia* acumula lipídeos quando em meio inadequado, já que as vesículas de lipídeos atuam também como reservas de nutrientes e outros compostos de

interesse nutricional para o organismo (Thiam, Farese Jr & Walther, 2013). Isso pode oferecer explicação para o súbito acúmulo de massa seca nos momentos iniciais da cultura quando em presença de altos níveis da xilose não-assimilável. Na mesma linha, Fickers et al. (2005) descreveu uma hipótese para o crescimento não esperado de *Y. lipolytica* em meio não adequado para seu metabolismo: o surfactante *Yansan*, secretado pela levedura, seria responsável por solubilizar compostos do meio e manter esses recursos à disposição do microrganismo.

Em nosso trabalho, as culturas permanentes das linhagens nativa e transformantes foram ativadas em placas YPD e, depois de 24h de crescimento, colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em meio YPD líquido, sendo que, após 10 – 20h de crescimento, diluições do pré-inóculo inicial foram realizadas nos meios de cultura apropriados. Nesse contexto, é de se esperar que todas as linhagens acumularam nutrientes em suas células durante as etapas de crescimento em YPD. Quando em contato com o meio YPD novamente, podemos hipotetizar que as leveduras, já com a maquinaria celular adequada para esse ambiente, continuaram seu crescimento, resultando em níveis similares de massa seca total; entretanto, em contato com os meios ricos em xilose (e a exaustão rápida/ausência da glicose) e sem condições para assimilar a pentose, a linhagem nativa mobilizou rapidamente seus recursos intracelulares, tendo grande crescimento, mas seguido por um estancamento igualmente rápido pela exaustão dos nutrientes do meio. Por outro lado, as linhagens transformantes, agora capazes de assimilar xilose – mesmo que em uma taxa lenta – não precisariam consumir todos os seus recursos, pois estavam sendo capazes de assimilar os do meio. Assim, podemos hipotetizar que seu crescimento lento, porém longo, permitiu uma conversão dos nutrientes carbônicos para matéria orgânica fixada em sua biomassa.

Essa hipótese parece ser suportada pelos dados de consumo de glicose pelas quatro linhagens nos meios YPDX 0,5% e YPDX 1,5% (**Figuras 21 e 22**). A glicose esgota-se em 16h (YPDX 0,5%) e 28h (YPDX 1,5%), sendo estes os pontos do crescimento em que a linhagem nativa tem crescimento acelerado em termos de massa seca. No restante da curva de consumo, pode-se observar que as linhagens transformantes consomem xilose, mesmo a baixa intensidade, ao contrário da linhagem nativa.

Foi utilizado meio YPD por ser meio de cultura rico, permitindo o crescimento rápido de *Yarrowia* por sua abundância de nutrientes. Aparentemente, tal abundância gerou



resultados *a priori* inesperados, mas serviu para corroborar o melhor desempenho das linhagens transformantes sobre a nativa em um segundo momento.

Quanto ao crescimento em meios pobres em nitrogênio (peptona e extrato de levedura), todas as linhagens se comportaram de modo semelhante (**Figuras 29, 30 e 31**). A seguinte especulação pode ser colocada para explicar esses resultados: em meios pobres em nitrogênio, o limitante ao crescimento é justamente o nitrogênio. Assim, nos meios YnP (com suplementação carbônica glicose ou xilose), é imprescindível que todas as células presentes no meio adequem suas maquinarias celulares para combinar seus processos vitais em frente às dificuldades do meio, e sabe-se que isto é realizado principalmente por regulação da expressão gênica, no qual a célula irá focar a produção de proteínas de acordo com as necessidades fisiológicas do contexto em que vive (Watson et al., 2006; Griffiths et al, 2012). Em um cenário de forte restrição de substrato nitrogenado, espera-se que uma levedura nativa reduza a expressão gênica, respeitando suas necessidades fisiológicas. Entretanto, no caso de nossas leveduras transformantes, o gene heterólogo tem sua expressão comandada por um promotor exógeno e não natural. O promotor hp4d é conhecido por seu poderoso potencial na indução de expressão de genes heterólogos em *Y. lipolytica*, justamente por ser derivado do promotor XPR2 (pXPR2), que codifica para a enzima protease alcalina celular, uma das enzimas mais expressas nessa espécie (Ogrydziak et al., 1977). Manipulações gênicas feitas com esse promotor resultaram no híbrido hp4d, com potencial de expressão até 20 vezes superior ao pXPR2, mas sem o controle repressivo quando a célula se encontra em restrição de nitrogênio (Madzak, Treton e Blachin-Roland, 2000). Podemos hipotetizar que a levedura transformada com o gene XylA anexado ao promotor hp4d é uma linhagem dispendiosa para nitrogênio, e que, portanto, não apresenta bom fitness adaptativo em meios com restrição desse nutriente. Entretanto, ela ainda seria capaz o suficiente para produzir biomassa lipídica a partir da xilose no meio de cultura, justamente graças à essa produção excessiva de xilose isomerase. Por outro lado, a linhagem nativa não conseguiria lidar com a pentose, mas teria uma despesa de nitrogênio muito menor do que as transformantes. Assim, sua produção de biomassa se restringiria a uma maior proporção de produtos nitrogenados, ao invés de contar com lipídeos derivados da xilose. De acordo com nossa hipótese, o quadro final é que as linhagens nativa ou transformante de fato acumulam uma biomassa similar, mas por limitações nutricionais distintas.

Em concordância com essa hipótese, o acúmulo consideravelmente maior de biomassa na linhagem nativa (**Figura 28**) encontra explicação, pois o fator limitante de fonte de carbono assimilável foi removido, de modo que a linhagem Po1g nativa agora não encontra a crise nutricional que a xilose lhe proporcionava, pois há apenas glicose no meio e a maquinaria de regulação gênica dela é capaz de lidar com a falta de nitrogênio no meio. Em contrapartida, as linhagens transformantes, embora capazes de assimilar a glicose do meio (ao passo que essas vias não foram modificadas nas manipulações gênicas), seriam incapazes de lidar com a crise nutricional de nitrogênio, pois teriam um dreno constante e de alto nível derivado do gene XylA incorporado ao genoma sob controle do promotor hp4d, resultando em crescimento débil, quando comparado com sua contraparte nativa.

#### **4.8.3) Discussão: as similaridades e diferenças nas porcentagens de lipídeos em relação à massa seca total entre as linhagens Po1g Nativa e Transformantes**

O dado obtido a partir da divisão da massa de lipídeos pela massa seca total é a porcentagem de acúmulo lipídico. Naturalmente, o valor desse dado é uma consequência dos processos fisiológicos dados como hipóteses plausíveis nos **Itens 4.8.1 e 4.8.2**, mas uma discussão mais aprofundada dos resultados obtidos será apresentada a seguir.

Primeiramente, é importante explicar o nível de acúmulo muito maior nos crescimentos nos meios YnP (com restrição de nitrogênio) do que nos meios YP (com níveis normais de nitrogênio). Como mostrado de forma clara na **Figura 34** (assim como uma comparação entre os números de porcentagem lipídica indicados nas **Figuras 24, 25, 26 e 27** quando comparados com suas respectivas contrapartes nas **Figuras 28, 29, 30 e 31**), a porcentagem de acúmulo lipídico é sempre maior nos meios YnP, com restrição de nitrogênio, mas se pode observar que estes valores maiores se dão, em grande parte, à alta massa de lipídeo produzido pela levedura, e não pela baixa massa seca total sintetizada (**Figuras 24 – 31**). Esse fenômeno é conhecido e descrito para diversos grupos de leveduras, não apenas o gênero *Yarrowia*. Sitepu et al. (2013) realizou um notável trabalho utilizando 69 linhagens de leveduras oleagênicas, sendo que todas acumularam lipídeos quando em meios contendo restrição de nitrogênio.

A explicação metabólica para o fenômeno de acúmulo lipídico é dividida em quatro partes: produção de acetil-CoA e NADPH, biossíntese de cadeias de acil-graxos, alocação das porções acil para reservatórios de lipídeos polares ou neutros e síntese das

vesículas lipídicas (Moreton, 1988). A concentração de nitrogênio no meio influencia a primeira: em verdade, esse é o sinal para que se inicie a síntese e acúmulo de lipídeos. Com a depleção desse nutriente a célula responde ativando a AMP deaminase, com o objetivo de mobilizar o nitrogênio dessas moléculas. Isso promove uma queda nos conteúdos celulares de AMP, o que estanca a atividade da enzima mitocondrial isocitrato desidrogenase. Como consequência, a produção de  $\alpha$ -cetoglutarato cai e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos é inibido. Por conseguinte, o isocitrato, que antes entrava no ciclo, passa a acumular na mitocôndria, o que leva a enzima mitocondrial aconitase a converter tal excedente em citrato. Tal composto, por sua vez, é captado pelo transportador citrato/malato translocase e levado ao citoplasma, onde é clivado a oxaloacetato e acetil-CoA pela ATP:citrato liase, enzima exclusiva de espécies oleogênicas.

No passo seguinte, o oxaloacetato é reduzido a malato pela malato desidrogenase e o malato formado é convertido a piruvato pela enzima málica, gerando NADPH. O piruvato é transportado para a mitocôndria, onde é convertido de volta a oxaloacetato pela piruvato carboxilase, e depois a malato pela enzima málica. Após essa conversão, malato é direcionado ao citosol, onde é descarboxilado novamente a piruvato, para gerar mais uma molécula de NADPH. Esses NADPH formados são utilizados como transportadores de elétrons para etapas futuras da lipogênese (Garay et al, 2014). Assim, fica evidente o motivo do intenso acúmulo de lipídeos em meio com restrição de nitrogênio: a falta desse composto é o motor para que a lipogênese, justificando assim os dados obtidos entre as duas diferentes classes de meios de cultura. Para as diferenças entre os meios dentro de uma mesma classe, via de regra, o acúmulo lipídico é maior nos que contêm maior concentração de glicose, na seguinte ordem decrescente: YPD/YnPD, YPDX 1,5%/YnPDX 1,5%, YPDX 0,5%/YnPDX 0,5% e YPX/YnPX. Isso é facilmente explicável pois a glicose é um açúcar mais facilmente assimilável do que xilose, mesmo entre as linhagens transformantes; a conversão do carbono ali presente em lipídeo é realizada mais facilmente do que a conversão dos carbonos da xilose.

Na **Figura 25**, o crescimento das quatro linhagens em YPX evidencia que a linhagem nativa tem porcentagem de lipídeos duas vezes maior que as linhagens transformantes. Isso se explica pelo fato de a nativa ter produzido pouquíssima massa seca (como indicado na mesma figura). Entretanto, quando os números de massa de lipídeos produzido e massa seca total são comparados entre as linhagens nativa e transformantes, é possível observar que os transformantes possuem os maiores níveis, indicando maior *fitness*

dessa linhagem nesse meio de cultura, provavelmente gerado pelo gene XylA ali inserido (vide discussões nos itens **4.8.1** e **4.8.2**).

Também foi possível observar que as linhagens transformantes tiveram maior porcentagem de lipídeos do que a nativa (cerca de 25% a mais), e essa maior porcentagem é uma consequência direta da massa lipídica produzida nesse meio, uma vez que as massas secas para as quatro linhagens foram semelhantes(**Figura 29**). Em meio cuja única fonte de carbono é a xilose (uma vez que há a ausência de fontes nitrogenadas, impedindo a conversão do carbono nessas moléculas em biomassa), é significativo que tamanha diferença tenha sido observada entre a nativa e as três transformantes com o gene XylA (vide discussões nos itens **7.4.1** e **7.4.2** e dados nas **Figuras 32, 33 e 34**).

Também é importante comentar que, em meio YnPDX 0,5%, meio com muita xilose e pouca glicose (proporção 3:1) e contendo pouquíssimo nitrogênio, seria esperado que a linhagem transformante produzisse maior massa lipídica e massa seca, graças ao gene XylA nela inserido, o que de fato acontece(**Figuras 32, 33 e 34**). Exatamente pelas altas produções de ambas as massas, tem-se que a porcentagem de lipídeos na linhagem nativa é maior: sua incapacidade de assimilar o carbono das pentoses fez com que, em uma análise final, sua proporção lipídica tenha sido superior pelo baixíssimo acúmulo de biomassa total. Esse resultado apenas corrobora o fato de a linhagem transformante ter melhor fitness em um meio com xilose, quando se comparando com um nativa.

Por outro lado, considerando o crescimento nos meios YPX e YPDX 0,5%, observa-se que a linhagem nativa produz mais massa seca e maior massa lipídica do que a linhagem transformante, em ambos os meios, apesar do excedente de xilose nos dois casos. Para explicar tal fenômeno, retomamos a especulação sobre o dreno intenso e constante de nitrogênio que a transformação da construção promotor hp4d+XylA representa para a transformante. Em um meio rico em nitrogênio, tal fator não representa prejuízo para o crescimento da levedura, embora ainda possa ter influência. É preciso lembrar que, apesar de agora ser capaz de em teoria assimilar xilose como biomassa, tem-se diversas outras dificuldades no processo de utilização desse açúcar por microrganismos. A primeira delas é a questão dos transportadores transmembrana que carregam açúcares para o interior celular. O único trabalho que apresenta a análise dos transportadores de açúcar em *Yarrowia* afirma que o transportador *YALI0C06424* apresenta baixíssima afinidade por xilose, enquanto que carrega glicose com extrema eficiência (Young et al., 2011). Os transportadores HXT,

conhecidos em *Saccharomyces cerevisiae*, se destacam pela sua alta afinidade por glicose, embora poucos deles sejam sensíveis a xilose e outros açúcares; o transportador de *Yarrowia*, aparentemente, não se encaixa na classe de transportadores promíscuos, o que seria esperado, pois *Y. lipolytica* não tem história evolutiva ligada a consumo de xilose, mas sim a substratos hidrofóbicos (Barth e Gaillardin, 1996).

Outra questão relevante a ser discutida é o efeito do nível de atividade da enzima heteróloga expressa em nossos estudos. O processo de transformação de leveduras com enzimas de bactéria para consumo de xilose é utilizado há bastante tempo, utilizando *Saccharomces cerevisiae*. Considerando a mesma enzima, xilose isomerase XylA, vinda da mesma bactéria, *Piromyces*, calculou-se para este microrganismo um rendimento teórico de 0,51g etanol/g xilose, mas foi registrado, outrossim, uma produção real efetiva de 0,09 a 0,23 g etanol/g xilose (Bikard et al., 2010; Matsushika et al., 2009), com um máximo de 0,43g etanol/g xilose (Karhumaa et al., 2007). Matsushika, 2009, aponta que as maiores dificuldades de melhoria desse processo são a *misfolding* da proteína heteróloga após a tradução, as modificações pós-traducionais e as formações de pontes dissulfeto na xilose isomerase produzida, gerando uma enzima com atividade sub-ótima. Uma vez que tais fatores estão em operação no conhecido modelo *S. cerevisiae*, é de se esperar que dificuldades semelhantes surjam na ainda pouco estudada *Y. lipolytica*.

Em resumo, pode-se elaborar uma explicação para os motivos de a linhagem transformante apresentar menor taxa de produção de lipídeos e massa seca total do que uma nativa em meio rico em xilose e nitrogênio. Se por um lado a xilose não é assimilável pela linhagem nativa, ela pode metabolizar o carbono originado das fontes nitrogenadas – as proteínas da peptona e extrato de levedura. Enquanto isso, a levedura transformante pode fazer o mesmo, mas simultaneamente precisa lidar com o dreno de nutrientes para a expressão de XylA, induzido pelo promotor hp4d. O produto desse gene, apesar de em teoria conceder maior *fitness* para o meio com xilose, nesse contexto nada mais é que uma carga prejudicial, pois sua atividade não é o suficiente para retornar nutrientes para a levedura (se ele apresentar os mesmos problemas que apresenta em *Saccharomyces cerevisiae*), em conjunção com a atividade pouco eficiente dos transportadores de xilose. Com esse dreno sem trazer recursos de volta, a levedura transformante é constantemente obrigada a retirar nutrientes de suas reservas de massa seca e lipídica, gerando assim os menores números em massa desses componentes orgânicos quando comparado com a levedura nativa, que cresce sem esse atraso.

## 5. CONCLUSÕES

A partir deste trabalho, é possível concluir:

- Realizei a idealização de uma estratégia de modificação genética para o aumento de consumo de xilose e, portanto, da produção de lipídeos
- Clonei o gene selecionado, de forma a adaptar seus códons ao codon usage de *Yarrowia*.
- Elaborei a construção para a expressão.
- Elaborei um protocolo de transformação melhorado e eficiente.
- Obtive transformantes e confirmei a expressão do transgene.
- Avaliei o fenótipo dos transformantes para crescimento, consumo de açúcares e produção de lipídeos.
- Houve tendência de maior consumo de xilose nos transformantes.
- Embora tenha havido tendência de aumento de produção de lipídeos em alguns meios, ainda é necessário melhorar a eficiência do processo.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

*Yarrowia lipolytica* apresenta grande potencial enquanto candidata a futura plataforma biotecnológica para a produção de oleoquímicos; entretanto, pesquisas adicionais são necessárias. Primeiramente, é necessário conhecer os limites do potencial de *Yarrowia* em consumir diferentes fontes carbônicas, em especial aquelas originadas de material nitrogenado. Isso permitiria que as condições de cultivo em estudos fossem melhor delimitadas, além de ser um substrato interessante de pesquisas que poderiam potencializar a aquisição, assimilação e metabolização de carbono de compostos distintos tendo como objetivo a produção de biomassa lipídica, abrangendo ainda mais as aplicações dessa espécie. Nessa linha, dados de transcriptômica e proteômica seriam de grande valia, ao permitir a consolidação (ou refutação) das hipóteses aqui apresentadas. Por exemplo, uma hipótese levantada foi a possibilidade de ocorrência de repressão catabólica em *Yarrowia*. Não há bibliografia sobre esse tema nessa espécie específica, mas futuros trabalhos de transcriptômica e proteômica poderiam auxiliar na análise desse fenômeno.

Os problemas referentes à produção de lipídeos foram explicados em 4.8.3, e mostram uma similaridade com as dificuldades na utilização da via da xilose isomerase em *S. cerevisiae*. Não seria de se impressionar que os estudos realizados no organismo-modelo oferecessem aplicações em nossa levedura oleogênica. Considerando o avançado estado em que as pesquisas com o etanol de segunda geração se encontram, com a recente abertura de diversas refinarias em países de pesquisa de ponta nessa área – Estados Unidos e Brasil como os mais proeminentes – o quadro global de pesquisas na utilização de material lignocelulósico como substrato para *Y. lipolytica* também respira ares de otimismo, com o intercâmbio de técnicas entre esses organismos.

Os maiores gargalos que dificultam a obtenção de resultados mais definitivos certamente são aqueles que outras leveduras já apresentaram ao longo de seu histórico de manipulações em laboratório. São eles: integração de um pequeno número de transgenes, baixo nível da expressão desses transgenes (derivados de problemas e limitações da maquinaria de regulação gênica natural da levedura receptora), problemas no enovelamento da proteína heteróloga e o desbalanço redox derivado da inserção de uma nova via bioquímica. Considerando mais especificamente a questão do consumo da xilose por *Yarrowia* tem-se também que o xilitol (produto intermediário da via oxirredutiva natural da oleaginosa) inibe a enzima xilose isomerase; além disso, os transportadores de xilose de

*Yarrowia* são pouco expressos e tem baixíssima eficiência de modo que, embora exista a pentose no meio para o consumo da levedura, ela é incapaz de assimilá-lo com eficiência. Essas são os seis maiores pontos nos quais trabalhos futuros usando essa levedura para um melhor consumo de xilose através de expressão heteróloga de genes devem focar.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abghari, A., Chen, S., 2014. *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid- based biofuel and bioproducts. *Front. Energy Ressources*, 19.
- Amore, M.R., Wilhelm, C., Hollenberg, P., 1989. The fermentation of xylose – an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*, 30, pp. 351–357.
- ASPO, 2006. The oil age: world oil production 1859-2050. The Association for the Study of Peak Oil.
- Barth, G., Gaillardin, C., 1996. *Yarrowia lipolytica*. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, pp. 313–388.
- Beopoulos, A., *et. al.*, 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Ressearch*, 48 (6), pp. 375–387.
- Bikard, D., Julié-Galau, S., Cambray, G. e Mazel, D., 2010. The synthetic integron: an in vivo genetic shuffling device. *Nucleic Acids Ressearch*, 38(15).
- Bilanovick, D. *et al.*, 2009. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations – response surface methodology analysis. *Energy Conversion Management*, 50 (2), 262-267.
- Brat, D., Boles, E., Wiedemann, B., 2009. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 75, pp. 2304–2311.
- Bligh, E. G., e Justin Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), pp. 911 - 917.
- Doran, J.B. *et. al.*, 2000. Fermentations of pectin- rich biomass with recombinant bacteria to produce fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84- 86(2), pp.141–52.

- EIA, 2006. International energy annual 2006. Análise lançada em junho-dezembro de 2008. :
- EIA, 2009. International energy annual 2009. Análise lançada em agosto de 2010. US Energy Information Administration, Washington DC.
- Fickers, P. et al., 2005. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5, n. 6-7, pp. 527 – 543.
- Fontanille P., et. al., 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 114, pp. 443–449.
- Fuhrmann, M. et al., 2004. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology*, 55 (6), pp. 869-881.
- Garay, L. A., Boundy-Mills, K. L. e German, J. B., 2014. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62 (13), pp. 2709-2727.
- Gibson, D. G., et al., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6 (5), pp. 12-16.
- Greer, M. S., et al., 2015. Engineering increased triacylglycerol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* using a modified type 1 plant diacylglycerol acyltransferase. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 99, pp. 2243–2253.
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carrol, S. B. e Doebley, J, 2012. Introduction to genetic analysis, W. H. Freeman and Company, New York.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22 (7), pp. 346-353.

- Hahn- Hägerdal, B. et al., 1994. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbiology Technology*, 16, pp.933–943.
- Hahn- Hägerdal, B. et al., 2001. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Advances in biochemical Engineering/Biotechnology*, 73, pp.53–84.
- Johansson, B., et. al., 2001. Xylulokinase overexpression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied Environmental Microbiology*, 67, pp. 4249–4255.
- Jolival, C., Madzak, C., Brault, A., Caminade, E., Malosse, C., & Mougin, C., 2005. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 66 (4), pp. 450-456.
- Karhumaa, K. et. al., 2007. Comparison of the xylose reductase- xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*.
- Khlaassen, P, et al. Fermentative production of ethanol from glucose, galactose and arabinose employing a recombinant yeast strain. *European Patent Register*, patent number: EP2451962.
- Khoury, G. A., 2009. Maranas Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity. *Protein Science*, 18, pp. 2125–2138.
- Kolouchová, I., et al., 2015. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresource Technology*, 192, pp. 726–734.
- Krishnan, C., et. al, 2010. Alkali- based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Issue Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), pp. 441–450.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. e Boekhout, T., 2011. The yeasts: A taxonomic study. *Elsevier Amsterdam*, 5 ed, pp. 927 – 929.
- Lanza, A. M., Curran, K., A., Rey, L. G.& Alper, H. S., 2014. A condition specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology*, 8 (33).
- Le Dall, M., T., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., 1993. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, 26 (1), pp. 38-44.
- Li, Z. J., Qiao, K., Liu, N. & Stephanopoulos, G., 2016. Engineering *Yarrowia lipolytica* for poly-3-hydroxybutyrate production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, pp. 1-8.
- Lithwick, G. & Margalit, H., 2003. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 13, pp. 2665-2673.
- Madigan, M. T., et al., 2010. *Microbiologia de Brock*. 12 ed., Porto Alegre: Artmed.
- Madzak, C., Treton, B. e Blanchin-Roland, S., 2000. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2, pp. 207 – 216.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., Sawayama, S., 2009. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology Technology*, 84(1), pp. 37-53.
- Matsushika, A., Sawayama, S., 2011. Comparative study on a series of recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. *Enzyme Microbial Technology*, 48, pp. 466–471.

- Moreton, R., 1988. Physiology of lipid accumulation, in: *Single Cell Oil. Editora Longman Scientific*, New York, 1 ed., pp. 1 – 32.
- Morin, N. et al. Transcriptomic analyses during the transition from biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *PLoS One*, 6.
- Nelson, D. L. e Cox, M. M., 2011. Princípios de bioquímica de Lehninger. *Porto Alegre: Editora Artmed*, 5 ed.
- Nicaud, J. M., Fournier, P., La Bonnardière, C., Gaillardin, C., 1991. Use of ars18 based vectors to increase protein production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 19 (2), pp. 259-270.
- NPC, The National Petroleum Council, 2012. Advancing technology for America's transportation future.
- Ogrydziak, D. M., Demain, A. L., e Tannenbaum, S. R., 1977. Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *Biochemical Biophysical Acta*, 497, pp. 525 – 538.
- Oliveira, P. H. S., 2014. Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Politécnica da Universidade Estadual de São Paulo.
- Papanikolaou, S., Aggeli, G., 2009. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 21, pp. 83- 87.
- Papanikolaou, S. et al., 2010. Suitability of low- cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy Fuels*, 24 (7), pp. 4078–4086.

- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, pp. 1052-1073.
- Parreiras, L. S., *et al.*, 2014. Engineering and two- stage evolution of a lignocellulosic hydrolysate tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain for anaerobic fermentation of xylose from AFEX pretreated corn stover. *Plos One*, 9 (9).
- Petschacher, B., Nidetzky, B., 2005. Engineering *Candida tenuis* xylose reductase for improved utilization of NADH: antagonistic effects of multiple side chain replacements and performance of site- directed mutants under simulated in vivo conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 71, pp. 6390–6393.
- Qiao, K., *et al.*, 2015. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 29, pp. 56-65.
- Randalls, S., 2010. History of the 2°C climate target. *Wiley Interdisciplinary Reviews – Climate Change*1, pp. 598-605.
- Ratledge, C. Single Cell Oils for the 21st Century.
- Ratledge, C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro- organisms. *Biochemical Society Trans*, 30, pp. 1047- 1050.
- Rojo, F., 2001. Mechanisms of transcricional repression. *Current Opinions in Microbiology*, 4, pp. 145-151.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(5), pp.279–91.
- Sambrook, J. & Russel, D. W., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory

- Sheff, M. & Thorn, K. S., 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21, 661-670.
- Sitepu, I. R. et al., 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a variety of known and new oleaginous yeasts species. *Biorresources Technology*, pp. 1 – 23.
- Stephanopoulos, G., Tai, M., 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, pp. 1-9.
- Thiam, A. R., Farese Jr, R., V., Walther, T. C., 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, pp. 775-786
- Tomás- Pejó, E., Oliva, J.M. & Ballesteros, M., 2008. Realistic approach for full- scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, pp.874– 884.
- Tsao, G. et. al., 1999. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 65, pp. 93–115.
- Tsigie, Y. A. et. al., 2012. Oil production from *Yarrowia lipolytica* Po1g using rice bran hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, Article ID 378384, 10 pages.
- van Hoek, P., van Dijken, J. P.& Pronk, J., 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(910), pp.724–736.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. e Losick, R., 2006. *Biologia Molecular do Gene. Porto Alegre: Editora Artmed*, 5 ed.

- Wiedemann, B., Boles, E., 2008. Codon- optimized bacterial genes improve l- arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 74, pp. 2043–2050.
- Win, S. S., Impoolsup, A., Noomhorm, A., 1996. Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 117-123.
- Young, E., Poucher, A., Comer, A., Bailey, A. e Alper, H., 2011. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), pp. 3311-3319.
- Zaldivar, J., Nielsen, J. & Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1- 2), pp.17–34.
- Zhang, M. et al., 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 267, pp.240–243.
- Zhang, H., Wu, S., 2014. Efficient sugar release by acetic acid ethanol- based organosolv pretreatment and Enzymatic saccharification. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62 (48), pp 11681- 1687.
- Zhou, H., 2011. Metabolic engineering of yeast for xylose uptake and fermentation. Dissertação de doutorado apresentada ao Massachusetts Institute of technology, p.157.



## 8. ANEXOS COMPLEMENTARES

A seguir encontram-se todas as tabelas com os dados de crescimento, consumo de glicose e xilose e produção de lipídeos, massa seca e porcentagem de lipídeos nos diferentes meios de cultura, referenciadas ao longo da dissertação, as quais originaram os gráficos ilustrados.

**Tabela 6:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g nativa em YPD e YPX. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. O meio YPX apresenta uma coluna a menos pois o terceiro inóculo foi perdido para uma contaminação

Meio de cultura												
								YPX				
Hrs	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,234	0,242	0,248	0,24	0,01	0,00	0,176	0,212	0,19	0,03	0,01
8	2	0,294	0,329	0,304	0,31	0,02	0,01	0,345	0,317	0,33	0,02	0,01
12	3	0,442	0,452	0,438	0,44	0,01	0,00	0,455	0,414	0,43	0,03	0,02
16	4	0,612	0,807	0,79	0,74	0,11	0,06	0,57	0,592	0,58	0,02	0,01
20	5	0,807	0,79	0,81	0,80	0,01	0,01	0,77	0,795	0,78	0,02	0,01
24	6	1,85	1,83	1,56	1,75	0,16	0,09	1,56	1,5	1,53	0,04	0,02
28	7	2,19	2,25	2,22	2,22	0,03	0,02	1,92	1,87	1,90	0,04	0,02
32	8	2	2,57	2,66	2,41	0,36	0,21	2,44	2,43	2,44	0,01	0,00
36	9	3,13	2,67	2,79	2,86	0,24	0,14	2,28	2,46	2,37	0,13	0,07
40	10	3,12	3,08	2,63	2,94	0,27	0,16	2,64	2,71	2,68	0,05	0,03
44	11	3,42	3,6	2,93	3,32	0,35	0,20	2,39	2,66	2,53	0,19	0,11
48	12	3,52	3,4	3,2	3,37	0,16	0,09	1,94	2,54	2,24	0,42	0,24
52	13	4,01	3,21	3,47	3,56	0,41	0,24	1,88	1,68	1,78	0,14	0,08
56	14	5,35	5,28	5,87	5,50	0,32	0,19	1,24	1,36	1,30	0,08	0,05
60	15	6,87	6,19	6,64	6,57	0,35	0,20	1,28	1,44	1,36	0,11	0,07
64	16	7,38	7,69	8,02	7,70	0,32	0,18					
68	17	8,45	8,32	8,88	8,55	0,29	0,17					
72	18	9,03	9,16	9,33	9,17	0,15	0,09					
76	19	8,99	8,92	8,67	8,86	0,17	0,10					

**Tabela 7:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g nativa em YPDX 0,5% e YPDX 1,5%. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

Meio de cultura													
YPDX 0,5%								YPDX 1,5%					
Hrs	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,27	0,215	0,218	0,23	0,03	0,02	0,223	0,214	0,209	0,22	0,01	0,00
8	2	0,32	0,295	0,298	0,30	0,01	0,01	0,291	0,282	0,257	0,28	0,02	0,01
12	3	0,442	0,422	0,371	0,41	0,04	0,02	0,395	0,41	0,389	0,40	0,01	0,01
16	4	0,595	0,563	0,574	0,58	0,02	0,01	0,536	0,537	0,545	0,54	0,00	0,00
20	5	0,78	0,711	0,739	0,74	0,03	0,02	0,795	0,853	0,77	0,81	0,04	0,02
24	6	1,69	1,79	1,35	1,61	0,23	0,13	1,74	1,75	1,3	1,60	0,26	0,15
28	7	1,97	2,12	1,67	1,92	0,23	0,13	1,74	1,68	1,48	1,63	0,14	0,08
32	8	2,48	1,9	1,99	2,12	0,31	0,18	2,02	1,65	1,79	1,82	0,19	0,11
36	9	2,45	2,55	1,9	2,30	0,35	0,20	2,86	2,22	2,7	2,59	0,33	0,19
40	10	2,92	2,74	2,61	2,76	0,16	0,09	3,03	2,86	2,65	2,85	0,19	0,11
44	11	3	2,56	2,7	2,75	0,22	0,13	3,48	2,69	2,88	3,02	0,41	0,24
48	12	3,28	2,97	2,82	3,02	0,23	0,14	3,87	3,19	3,86	3,64	0,39	0,23
52	13	3,24	3,13	2,74	3,04	0,26	0,15	4,82	4,98	4,62	4,81	0,18	0,10
56	14	5,72	5,79	5,55	5,69	0,12	0,07	6,23	6,22	6,81	6,42	0,34	0,20
60	15	6,88	6,89	6,02	6,60	0,50	0,29	7,89	7,44	7,27	7,53	0,32	0,18
64	16	7,3	7,49	7,9	7,56	0,31	0,18	8,22	8,35	8,92	8,50	0,37	0,21
68	17	8,43	8,36	8,17	8,32	0,13	0,08	9,11	9	9,05	9,05	0,06	0,03
72	18	9,52	9,15	9,22	9,30	0,20	0,11	9,56	9,37	9,34	9,42	0,12	0,07
76	19	8,63	8,09	8,75	8,49	0,35	0,20	8,66	8,71	8,92	8,763333	0,14	0,08

**Tabela 8:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g Transformante 1 em YPD e YPX. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

Meio de cultura													
	YPD							YPX					
Hrs	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,337	0,329	0,355	0,34	0,01	0,01	0,07	0,077	0,068	0,07	0,00	0,00
8	2	0,442	0,433	0,436	0,44	0,00	0,00	0,03	0,034	0,037	0,03	0,00	0,00
12	3	0,552	0,52	0,527	0,53	0,02	0,01	0,121	0,122	0,117	0,12	0,00	0,00
16	4	0,666	0,652	0,674	0,66	0,01	0,01	0,154	0,164	0,172	0,16	0,01	0,01
20	5	0,77	0,778	0,76	0,77	0,01	0,01	0,165	0,181	0,19	0,18	0,01	0,01
24	6	0,901	0,919	0,929	0,92	0,01	0,01	0,237	0,24	0,238	0,24	0,00	0,00
28	7	1,28	1,387	1,156	1,27	0,12	0,07	0,279	0,265	0,306	0,28	0,02	0,01
32	8	1,84	1,68	1,64	1,72	0,11	0,06	0,292	0,309	0,403	0,33	0,06	0,03
36	9	2,24	2,16	2,12	2,17	0,06	0,04	0,311	0,317	0,353	0,33	0,02	0,01
40	10	3,52	2,88	2,96	3,12	0,35	0,20	0,325	0,34	0,409	0,36	0,04	0,03
44	11	4,4	5,06	4,33	4,60	0,40	0,23	0,336	0,385	0,444	0,39	0,05	0,03
48	12	5,83	4,95	5,28	5,35	0,44	0,26	0,44	0,443	0,467	0,45	0,01	0,01
52	13	6,08	5,2	6,35	5,88	0,60	0,35	0,41	0,39	0,488	0,43	0,05	0,03
56	14	5,78	4,89	5,14	5,27	0,46	0,27	0,553	0,528	0,512	0,53	0,02	0,01
60	15	8,87	8,81	8,62	8,77	0,13	0,08	0,452	0,467	0,594	0,50	0,08	0,05
64	16	9,6	9,02	9,49	9,37	0,31	0,18						
68	17	9,28	8,53	8,32	8,71	0,50	0,29						
72	18	9,04	8	6,62	7,89	1,21	0,70						
76	19	9,74	7,46	5,46	7,55	2,14	1,24						

**Tabela 9:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g Transformante 1 em YPD 0,5% e YPD 1,5%. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

Meio de cultura													
Hrs	YPD 0,5%							YPD 1,5%					
	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,151	0,153	0,156	0,15	0,00	0,00	0,277	0,252	0,282	0,27	0,02	0,01
8	2	0,337	0,308	0,293	0,31	0,02	0,01	0,205	0,204	0,192	0,20	0,01	0,00
12	3	0,397	0,479	0,471	0,45	0,05	0,03	0,279	0,298	0,279	0,29	0,01	0,01
16	4	0,605	0,582	0,618	0,60	0,02	0,01	0,41	0,433	0,423	0,42	0,01	0,01
20	5	0,471	0,528	0,533	0,51	0,03	0,02	0,737	0,756	0,758	0,75	0,01	0,01
24	6	0,677	0,692	0,661	0,68	0,02	0,01	0,852	0,83	0,84	0,84	0,01	0,01
28	7	0,728	0,767	0,802	0,77	0,04	0,02	1,36	1,26	1,28	1,30	0,05	0,03
32	8	1,34	1,16	1,24	1,25	0,09	0,05	1,52	1,42	1,34	1,43	0,09	0,05
36	9	2,12	2,44	1,88	2,15	0,28	0,16	2,68	2,36	2,08	2,37	0,30	0,17
40	10	3,97	4,91	3,92	4,27	0,56	0,32	4,58	4,06	3,65	4,10	0,47	0,27
44	11	4,54	4,93	4,97	4,81	0,24	0,14	5,36	5,8	6	5,72	0,33	0,19
48	12	5,36	5,44	5,66	5,49	0,16	0,09	7,19	6,68	6,1	6,66	0,55	0,31
52	13	6,87	6,88	5,74	6,50	0,66	0,38	8,47	5,83	7,22	7,17	1,32	0,76
56	14	6,04	7,28	7,5	6,94	0,79	0,45	8,92	6,22	8,04	7,73	1,38	0,80
60	15	6,16	7,55	7,57	7,09	0,81	0,47	9,34	6,78	8,21	8,11	1,28	0,74
64	16	6,89	7,95	7,23	7,36	0,54	0,31	9,66	6,55	8,83	8,35	1,61	0,93
68	17	6,44	7,44	5,65	6,51	0,90	0,52	9,62	6,46	8,48	8,19	1,60	0,92
72	18	7,82	6,78	7,64	7,41	0,56	0,32	8,06	6	8,6	7,55	1,37	0,79
76	19	5,22	7,58	7,1	6,63	1,25	0,72	8,22	6,34	7,88	7,48	1,00	0,58

**Tabela 10:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g Transformante 2 em YPD e YPX. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

Meio de cultura													
	YPD							YPX					
Hrs	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,372	0,387	0,312	0,36	0,04	0,02	0,13	0,21	0,14	0,16	0,04	0,03
8	2	0,448	0,489	0,487	0,47	0,02	0,01	0,09	0,08	0,09	0,09	0,01	0,00
12	3	0,521	0,562	0,573	0,55	0,03	0,02	0,14	0,11	0,134	0,13	0,02	0,01
16	4	0,659	0,611	0,629	0,63	0,02	0,01	0,152	0,122	0,142	0,14	0,02	0,01
20	5	0,712	0,733	0,788	0,74	0,04	0,02	0,166	0,132	0,155	0,15	0,02	0,01
24	6	0,958	0,993	0,942	0,96	0,03	0,02	0,193	0,156	0,162	0,17	0,02	0,01
28	7	1,34	1,382	1,132	1,28	0,13	0,08	0,203	0,179	0,182	0,19	0,01	0,01
32	8	1,99	1,73	1,32	1,68	0,34	0,20	0,247	0,188	0,214	0,22	0,03	0,02
36	9	2,32	2,45	2,84	2,54	0,27	0,16	0,251	0,196	0,222	0,22	0,03	0,02
40	10	3,62	2,76	2,61	3,00	0,55	0,31	0,274	0,226	0,251	0,25	0,02	0,01
44	11	4,63	5,21	4,87	4,90	0,29	0,17	0,288	0,253	0,279	0,27	0,02	0,01
48	12	5,32	5,62	5,81	5,58	0,25	0,14	0,302	0,287	0,277	0,29	0,01	0,01
52	13	6,36	5,82	6,72	6,30	0,45	0,26	0,339	0,316	0,307	0,32	0,02	0,01
56	14	7,21	6,43	7,43	7,02	0,53	0,30	0,334	0,364	0,355	0,35	0,02	0,01
60	15	8,43	8,64	8,91	8,66	0,24	0,14	0,371	0,378	0,361	0,37	0,01	0,00
64	16	9,13	9	9,5	9,21	0,26	0,15						
68	17	9,42	8,66	8,54	8,87	0,48	0,28						
72	18	9,28	8,45	8,22	8,65	0,56	0,32						
76	19	9,93	7,84	6,82	8,20	1,59	0,92						

**Tabela 11:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g Transformante 2 em YPDx 0,5% e YPDx 1,5%. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

Meios de cultura													
Hrs	YPDx 0,5%							YPDx 1,5%					
	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,234	0,268	0,229	0,24	0,02	0,01	0,243	0,275	0,229	0,25	0,02	0,01
8	2	0,371	0,302	0,317	0,33	0,04	0,02	0,287	0,253	0,205	0,25	0,04	0,02
12	3	0,428	0,451	0,442	0,44	0,01	0,01	0,299	0,34	0,31	0,32	0,02	0,01
16	4	0,637	0,592	0,682	0,64	0,05	0,03	0,402	0,482	0,448	0,44	0,04	0,02
20	5	0,482	0,563	0,576	0,54	0,05	0,03	0,734	0,783	0,749	0,76	0,03	0,01
24	6	0,683	0,692	0,673	0,68	0,01	0,01	0,885	0,849	0,822	0,85	0,03	0,02
28	7	0,703	0,754	0,839	0,77	0,07	0,04	1,38	1,32	1,73	1,48	0,22	0,13
32	8	1,25	1,48	1,42	1,38	0,12	0,07	1,88	1,83	1,43	1,71	0,25	0,14
36	9	2,48	2,3	1,93	2,24	0,28	0,16	2,84	2,79	2,38	2,67	0,25	0,15
40	10	3,79	4,69	4,47	4,32	0,47	0,27	4,68	4,37	3,41	4,15	0,66	0,38
44	11	4,66	5,32	4,91	4,96	0,33	0,19	5,72	5,9	6,07	5,90	0,18	0,10
48	12	5,83	5,91	5,78	5,84	0,07	0,04	6,3	6,49	6,18	6,32	0,16	0,09
52	13	6,37	6,00	5,43	5,93	0,47	0,27	8,37	6,22	5,38	6,66	1,54	0,89
56	14	6,04	7,42	6,72	6,73	0,69	0,40	8,55	7,94	8,84	8,44	0,46	0,27
60	15	7,65	8,22	7,98	7,95	0,29	0,17	10,36	8,99	9,74	9,70	0,69	0,40
64	16	7,43	9,17	9,02	8,54	0,96	0,56	10,21	9,92	10,45	10,19	0,27	0,15
68	17	7,84	9,21	8,45	8,50	0,69	0,40	9,43	7,51	8,88	8,61	0,99	0,57
72	18	8,93	7,45	8,81	8,40	0,82	0,47	7,83	6,03	8,13	7,33	1,14	0,66
76	19	7,32	7,98	7,48	7,59	0,34	0,20	8,15	7,44	7,79	7,79	0,36	0,20

**Tabela 12:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g Transformante 3 em YPD e YPX. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há apenas duas replicatas no meio YPD pois a terceira estava contaminada, sendo necessário o descarte do inóculo referente.

Meios de cultura												
Hrs	YPD						YPX					
	Pto	1	2	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,34	0,339	0,34	0,00	0,00	0,183	0,156	0,178	0,17	0,01	0,01
8	2	0,505	0,47	0,49	0,02	0,02	0,083	0,055	0,036	0,06	0,02	0,01
12	3	0,679	0,708	0,69	0,02	0,01	0,102	0,089	0,094	0,10	0,01	0,00
16	4	1,096	1,142	1,12	0,03	0,02	0,092	0,071	0,074	0,08	0,01	0,01
20	5	1,212	1,378	1,30	0,12	0,08	0,091	0,088	0,083	0,09	0,00	0,00
24	6	1,83	1,66	1,75	0,12	0,09	0,066	0,069	0,058	0,06	0,01	0,00
28	7	1,9	2,04	1,97	0,10	0,07	0,063	0,051	0,05	0,05	0,01	0,00
32	8	2,08	2,43	2,26	0,25	0,18	0,045	0,052	0,034	0,04	0,01	0,01
36	9	2,35	2,49	2,42	0,10	0,07	0,113	0,137	0,121	0,12	0,01	0,01
40	10	3,66	3,01	3,34	0,46	0,33	0,162	0,191	0,181	0,18	0,01	0,01
44	11	5,18	4,72	4,95	0,33	0,23	0,258	0,275	0,24	0,26	0,02	0,01
48	12	5,92	5,49	5,71	0,30	0,22	0,261	0,269	0,238	0,26	0,02	0,01
52	13	6,59	6,83	6,71	0,17	0,12	0,299	0,284	0,292	0,29	0,01	0,00
56	14	7,71	7,99	7,85	0,20	0,14	0,331	0,301	0,309	0,31	0,02	0,01
60	15	8,33	8,57	8,45	0,17	0,12	0,327	0,322	0,317	0,32	0,01	0,00
64	16	9,91	9,46	9,69	0,32	0,23						
68	17	8,81	8,28	8,55	0,37	0,27						
72	18	8	8,18	8,09	0,13	0,09						
76	19	8,39	7,65	8,02	0,52	0,37						

**Tabela 13:** Medições em espectrofotômetro da absorbância das culturas de Po1g Transformante 3 em YPDX 0,5% e YPDX 1,5%. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

Meios de cultura													
Hrs	YPDX 0,5%							YPDX 1,5%					
	Pto	1	2	3	MED	DP	EP	1	2	3	MED	DP	EP
0	0	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00	0,2	0,2	0,2	0,20	0,00	0,00
4	1	0,102	0,094	0,1	0,10	0,00	0,00	0,27	0,192	0,241	0,23	0,04	0,02
8	2	0,238	0,251	0,28	0,26	0,02	0,01	0,151	0,169	0,156	0,16	0,01	0,01
12	3	0,267	0,314	0,39	0,32	0,06	0,04	0,212	0,218	0,279	0,24	0,04	0,02
16	4	0,463	0,485	0,502	0,48	0,02	0,01	0,36	0,327	0,336	0,34	0,02	0,01
20	5	0,662	0,669	0,687	0,67	0,01	0,01	0,541	0,502	0,489	0,51	0,03	0,02
24	6	1,208	1,162	1,172	1,18	0,02	0,01	0,872	0,914	0,882	0,89	0,02	0,01
28	7	1,396	1,28	1,472	1,38	0,10	0,06	1,16	1,371	1,36	1,30	0,12	0,07
32	8	1,34	1,16	1,24	1,25	0,09	0,05	1,24	1,55	1,52	1,44	0,17	0,10
36	9	1,98	2,36	2,01	2,12	0,21	0,12	2,10	2,01	1,93	2,01	0,09	0,05
40	10	4,17	4,82	3,45	4,15	0,69	0,40	4,44	3,98	3,41	3,94	0,52	0,30
44	11	4,98	5,12	5,41	5,17	0,22	0,13	5,66	6,04	5,97	5,89	0,20	0,12
48	12	5,38	5,86	5,72	5,65	0,25	0,14	7,38	6,28	6,33	6,66	0,62	0,36
52	13	6,72	6,99	6,30	6,67	0,35	0,20	7,97	6,98	5,98	6,98	1,00	0,57
56	14	7,38	7,71	7,20	7,43	0,26	0,15	9,02	6,82	9,03	8,29	1,27	0,74
60	15	6,83	8,68	9,45	8,32	1,35	0,78	11,32	8,47	8,39	9,39	1,67	0,96
64	16	7,31	9,93	10,25	9,16	1,61	0,93	10,87	9,02	8,92	9,60	1,10	0,63
68	17	7,77	8,58	8,17	8,17	0,41	0,23	10,48	8,32	7,92	8,91	1,38	0,80
72	18	9,48	7,98	7,60	8,35	0,99	0,57	7,59	7,00	8,21	7,60	0,61	0,35
76	19	5,53	7,39	7,69	6,87	1,17	0,68	7,62	7,38	7,71	7,57	0,17	0,10



**Tabela 14:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g nativa em YPD e YPX, em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

Hrs	Pto	YPD						YPX					
		1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	19,71	19,08	18,85	19,21	0,44	0,26	21,35	21,57	20,65	21,19	0,48	0,28
6	2	18,72	18,26	18,89	18,62	0,33	0,19	20,36	21,55	19,97	20,63	0,82	0,47
12	3	17,58	17,90	18,16	17,88	0,29	0,17	22,33	21,90	19,92	21,38	1,29	0,74
18	4	14,83	15,22	14,25	14,77	0,49	0,28	21,44	20,93	19,68	20,68	0,91	0,52
24	5	14,26	14,41	13,56	14,07	0,46	0,26	20,42	20,85	20,07	20,44	0,39	0,23
30	6	12,98	13,45	12,56	13,00	0,44	0,26	21,06	21,07	20,48	20,87	0,34	0,19
36	7	12,11	11,90	12,30	12,10	0,20	0,12	20,87	20,90	20,06	20,61	0,47	0,27
42	8	11,13	11,76	11,00	11,30	0,41	0,23	20,83	20,82	19,91	20,52	0,53	0,31
48	9		8,69		8,69	0,00	0,00	20,11	20,78	20,36	20,41	0,00	0,00
54	10	8,12	8,48	8,12	8,24	0,21	0,12	20,60	20,58	20,18	20,45	0,24	0,14
60	11	7,76	8,07	7,41	7,75	0,33	0,19	19,63	19,85	19,08	19,52	0,40	0,23
66	12	6,92	7,30	6,26	6,83	0,53	0,31	17,44	20,08	19,43	18,98	1,37	0,79
72	13	6,22	6,79	1,32	4,78	3,01	1,74	20,19	19,46	19,28	19,64	0,48	0,28
78	14	1,59	0,74	0,77	1,04	0,48	0,28	21,04	20,44		20,74	0,43	0,25

**Tabela 15:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g nativa em YPDX 0,5%, em g/L MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPDX 0,5%													
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	4,44	4,24	4,24	4,31	0,11	0,07	18,34	17,49	17,45	17,76	0,50	0,29
6	2	3,94	3,87	3,36	3,72	0,31	0,18	15,86	15,73	17,87	16,48	1,20	0,69
12	3	3,35	3,26	0,65	2,42	1,53	0,89	15,95	16,00	15,59	15,84	0,22	0,13
18	4	0,37	0,41	0,43	0,41	0,03	0,02	14,23	16,42	15,83	15,50	1,13	0,65
24	5	0,22	0,22	0,22	0,22	0,00	0,00	15,56	15,04	15,24	15,28	0,26	0,15
30	6	0,22	0,22	0,22	0,22	0,00	0,00	14,09	13,11	12,85	13,35	0,66	0,38
36	7	0,21	0,21	0,20	0,21	0,00	0,00	13,78	12,16	12,31	12,75	0,90	0,52
42	8	0,23	0,21		0,22	0,02	0,01	11,06	11,00		11,03	0,05	0,03
48	9	0,22	0,20	0,22	0,21	0,00	0,00	8,36	6,57	6,61	7,18	0,00	0,00
54	10	0,22	0,21	0,22	0,22	0,00	0,00	6,99	5,89	5,58	6,15	0,74	0,43
60	11	0,21	0,17	0,23	0,20	0,03	0,02	5,69	4,83	5,63	5,38	0,48	0,28
66	12		0,22	0,21	0,22	0,01	0,00		4,41	4,40	4,40	0,01	0,01
72	13	0,16	0,19	0,21	0,19	0,02	0,01	1,79	1,02	0,91	1,24	0,48	0,28
78	14	0,16	0,20	0,20	0,19	0,02	0,01	1,22	1,06	0,92	1,07	0,15	0,08

**Tabela 16:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g nativa em YPD<sub>X</sub> 1,5%, em g/L MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPD <sub>X</sub> 1,5%													
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	13,49	12,33	12,06	12,63	0,76	0,44	7,77	7,26	7,10	7,38	0,35	0,20
6	2	12,18	12,91	12,18	12,43	0,42	0,24	7,67	8,15	7,84	7,89	0,25	0,14
12	3		11,60	11,69	11,65	0,06	0,04		7,68	7,83	7,76	0,11	0,06
18	4	9,21	7,65	8,39	8,41	0,78	0,45	7,73	7,72	7,46	7,64	0,16	0,09
24	5	7,65	5,77	7,19	6,87	0,98	0,56	6,75	6,34	6,77	6,62	0,24	0,14
30	6	6,75	6,20	7,49	6,81	0,65	0,37	6,81	7,47	7,78	7,36	0,49	0,29
36	7	6,63	5,16	6,48	6,09	0,81	0,47	7,32	6,86	7,25	7,14	0,25	0,14
42	8	4,76	4,35	6,33	5,14	1,04	0,60	5,79	6,36	7,62	6,59	0,93	0,54
48	9	3,43	3,12	4,41	3,65	0,00	0,00	6,08	7,24	7,44	6,92	0,00	0,00
54	10	3,53	2,61	3,26	3,14	0,47	0,27	7,31	6,89	6,07	6,75	0,63	0,36
60	11	3,03	2,24	3,71	3,00	0,73	0,42	7,20	6,93	7,56	7,23	0,32	0,18
66	12	2,56	1,74	3,16	2,48	0,71	0,41	7,05	6,96	7,24	7,08	0,15	0,08
72	13	0,41	0,32	0,40	0,37	0,05	0,03	5,51	2,79	6,14	4,81	1,78	1,03
78	14		0,23	0,28	0,25	0,04	0,02		4,26	2,06	3,16	1,56	0,90

**Tabela 17:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 1 em YPD e YPX., em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPD								YPX					
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	19,84	19,24	19,49	19,52	0,30	0,17	22,027	21,139	21,228	21,46	0,49	0,28
6	2	18,04	18,32	18,29	18,21	0,15	0,09	21,322	21,937	20,654	21,30	0,64	0,37
12	3	17,30	17,41	17,78	17,50	0,25	0,14	20,552	21,192	20,744	20,83	0,33	0,19
18	4	13,59	14,14	14,53	14,09	0,47	0,27	18,78	19,251	18,815	18,95	0,26	0,15
24	5	12,50	13,43	14,06	13,33	0,78	0,45	19,759	19,426	18,652	19,28	0,57	0,33
30	6	11,55	12,38	12,87	12,27	0,66	0,38	19,631	19,486	17,975	19,03	0,92	0,53
36	7	10,59	11,60	11,99	11,39	0,73	0,42	20,06	19,065	18,054	19,06	1,00	0,58
42	8	9,64	10,67	10,38	10,23	0,53	0,31	19,521	19,396	17,687	18,87	1,02	0,59
48	9	6,65	7,94	8,48	7,69	0,94	0,54	19,656	18,726	18,257	18,88	0,71	0,41
54	10	6,43	6,81	7,55	6,93	0,57	0,33	19,29	19,121	18,262	18,89	0,55	0,32
60	11	5,67	6,59	6,93	6,39	0,65	0,38	19,389	19,014	18,032	18,81	0,70	0,40
66	12	4,91	5,72	6,57	5,74	0,83	0,48	18,301	18,727	18,427	18,48	0,22	0,13
72	13	0,40	1,03	1,56	1,00	0,58	0,34	18,867	16,644	18,566	18,03	1,21	0,70
78	14	0,17	0,41	0,79	0,46	0,31	0,18	19,024	17,483		18,25	1,09	0,77

**Tabela 18:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 1 em YPDX 0,5%, em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPDX 0,5%													
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	5,01	4,76	4,89	4,89	0,13	0,07	16,91	16,64	16,51	16,69	0,20	0,12
6	2	4,29	4,23	4,36	4,29	0,06	0,04	16,32	16,70	16,39	16,47	0,20	0,12
12	3	3,82	3,64	3,61	3,69	0,11	0,06	16,51	16,63	15,96	16,37	0,36	0,21
18	4	1,19	1,43	1,03	1,22	0,20	0,11	15,46	15,82	15,34	15,54	0,25	0,14
24	5	0,67	0,96	0,56	0,73	0,21	0,12	15,20	15,68	15,22	15,36	0,27	0,16
30	6	0,17	0,34	0,30	0,27	0,09	0,05	14,71	14,62	15,22	14,85	0,32	0,18
36	7			0,19	0,19	0,00	0,00		14,31	15,39	14,85	0,00	0,00
42	8	0,18	0,18	0,18	0,18	0,00	0,00	12,39	13,71	13,18	13,10	0,66	0,38
48	9	0,19	0,18	0,19	0,19	0,00	0,00	8,25	8,71	9,51	8,83	0,64	0,37
54	10	0,19	0,18	0,19	0,19	0,01	0,00	7,24	7,68	8,12	7,68	0,44	0,25
60	11	0,19	0,19	0,19	0,19	0,00	0,00	6,38	7,02	7,56	6,99	0,60	0,34
66	12	0,16	0,16	0,20	0,17	0,02	0,01	5,30	5,90	6,72	5,97	0,71	0,41
72	13	0,17	0,17		0,17	0,00	0,00	1,92	2,15		2,03	0,17	0,10
78	14	0,17	0,18	0,18	0,18	0,00	0,00	1,36	1,26	1,89	1,51	0,34	0,20

**Tabela 19:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 1 em YPDX 1,5%, em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPDX 1,5%													
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	14,37	13,83	13,51	13,90	0,43	0,25	7,03	6,82	6,58	6,81	0,23	0,13
6	2	13,15	12,97	13,33	13,15	0,18	0,10	6,75	6,57	6,79	6,70	0,11	0,07
12	3	9,03	9,38	8,84	9,09	0,27	0,16	7,21	7,06	6,79	7,02	0,21	0,12
18	4	7,85	8,60	8,33	8,26	0,38	0,22	6,94	6,93	6,85	6,91	0,05	0,03
24	5	7,31	7,78	7,66	7,58	0,24	0,14	7,10	6,90	6,81	6,94	0,15	0,09
30	6	6,45	6,48	7,18	6,70	0,41	0,24	6,73	6,76	6,80	6,77	0,03	0,02
36	7			7,04	7,04	0,00	0,00			6,44	6,44	0,00	0,00
42	8	5,97	6,17	6,09	6,07	0,10	0,06	6,65	6,28	6,19	6,37	0,24	0,14
48	9	4,01	4,84	5,28	4,71	0,64	0,37	6,78	6,78	6,69	6,75	0,05	0,03
54	10	3,35	4,24	4,72	4,10	0,69	0,40	6,74	6,61	6,59	6,64	0,08	0,05
60	11	2,94	3,80	2,18	2,97	0,81	0,47	6,78	6,65	7,07	6,83	0,22	0,12
66	12	3,25	3,75		3,50	0,35	0,20	6,70	6,46		6,58	0,17	0,10
72	13	0,40	0,58	1,28	0,75	0,47	0,27	5,32	6,08	6,06	5,82	0,43	0,25
78	14	1,01	0,42	0,28	0,57	0,38	0,22	6,30	6,03	6,43	6,25	0,20	0,12

**Tabela 20:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 2 em YPD e YPX., em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

Hrs	YPD							YPX					
	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	20,47	19,97	19,87	20,11	0,32	0,18	17,37	16,96	17,18	17,17	0,20	0,12
6	2	19,53	18,79	19,28	19,20	0,38	0,22	16,96	17,11	16,86	16,98	0,13	0,07
12	3	18,54	18,59	18,52	18,55	0,03	0,02	16,23	16,33	16,22	16,26	0,06	0,03
18	4	14,18	14,02	13,79	14,00	0,20	0,12	16,65	16,51	14,97	16,04	0,93	0,54
24	5	13,62	12,91	12,28	12,94	0,67	0,39	16,44	15,98	14,11	15,51	1,23	0,71
30	6	12,60	12,18	11,93	12,24	0,33	0,19	14,98	14,86	14,09	14,65	0,48	0,28
36	7	10,93	11,16	10,73	10,94	0,21	0,12	14,58	14,61	12,95	14,05	0,95	0,55
42	8	6,03	5,57	5,42	5,67	0,32	0,18	14,74	14,67	13,33	14,25	0,80	0,46
48	9	4,58	4,78	4,70	4,69	0,00	0,00	14,73	14,62	10,74	13,36	0,00	0,00
54	10	0,68	1,01	0,39	0,70	0,31	0,18	13,55	13,73	12,22	13,16	0,82	0,48
60	11	0,26	0,55	0,30	0,37	0,16	0,09	13,90	14,60		14,25	0,50	0,29

**Tabela 21:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 2 em YPDX 0,5% em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

	YPDX 0,5%												
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	4,85	5,137	4,958	4,98	0,14	0,08	13,31	13,78	13,26	13,45	0,29	0,17
6	2	4,003	3,686	4,359	4,02	0,34	0,19	11,63	11,06	13,19	11,96	1,10	0,64
12	3	4,028	3,466	3,322	3,61	0,37	0,22	13,07	13,06	12,12	12,75	0,55	0,32
18	4	0,876	0,534	0,181	0,53	0,35	0,20	11,98	12,02	11,54	11,85	0,27	0,15
24	5	0,39	0,353	0,131	0,29	0,14	0,08	11,94	11,81	10,69	11,48	0,69	0,40
30	6	0,164	0,131	0,139	0,14	0,02	0,01	11,28	10,26	9,456	10,33	0,91	0,53
36	7	0,127	0,122	0,128	0,13	0,00	0,00	10,26	9,506	8,463	9,41	0,90	0,52
42	8	0,121	0,104	0,11	0,11	0,01	0,00	2,782	2,499	2,054	2,44	0,37	0,21
48	9	0,124	0,117	0,126	0,12	0,00	0,00	0,788	0,448	0,624	0,62	0,17	0,10
54	10	0,116			0,12	0,00	0,00	0,397			0,40	0,00	0,00

**Tabela 22:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 2 em YPD<sub>X</sub> 1,5% em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPD <sub>X</sub> 1,5%													
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	14,38	14,65	13,73	14,26	0,47	0,27	6,09	6,238	5,89	6,07	0,17	0,10
6	2	13,35	13,55	13,35	13,42	0,11	0,07	5,812	5,925	5,826	5,85	0,06	0,04
12	3	12,72	12,92	12,34	12,66	0,29	0,17	5,834	5,91	5,585	5,78	0,17	0,10
18	4	8,895	8,412	9,04	8,78	0,33	0,19	5,441	5,46	5,588	5,50	0,08	0,05
24	5	8,876	7,898	8,881	8,55	0,57	0,33	5,911	5,568	5,886	5,79	0,19	0,11
30	6	6,739	6,709	7,294	6,91	0,33	0,19	5,039	5,35	5,437	5,28	0,21	0,12
36	7	6,33	5,893	6,267	6,16	0,24	0,14	5,223	5,256	5,167	5,22	0,04	0,03
42	8	2,217	3,031	1,867	2,37	0,60	0,34	5,108	5,283	5,19	5,19	0,09	0,05
48	9	1,468	2,473	1,344	1,76	0,62	0,36	5,033	5,13	5,183	5,12	0,08	0,04
54	10	0,347	0,369	0,392	0,37	0,02	0,01	2,317	3,014	2,605	2,65	0,35	0,20
60	11		0,303		0,30	0,00	0,00		1,869		1,87	0,00	0,00

**Tabela 23:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 3 em YPD e YPX., em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

YPD								YPX					
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	19,83	19,55	19,05	19,48	0,39	0,23	16,19	16,27	16,66	16,37	0,25	0,15
6	2	17,68	17,59	16,97	17,41	0,39	0,22	16,08	16,09	16,02	16,06	0,04	0,02
12	3	14,41	14,31	13,74	14,15	0,36	0,21	17,11	16,14		16,63	0,68	0,39
18	4	7,86	7,134	6,348	7,11	0,76	0,44	15,61	15,52	15,29	15,48	0,16	0,09
24	5	4,231	5,931	5,437	5,20	0,87	0,50	14,47	15,16	15,59	15,07	0,57	0,33
30	6	4,957	4,61	4,479	4,68	0,25	0,14	15,62	15,62	15,47	15,57	0,09	0,05
36	7	4,049	3,489	2,668	3,40	0,69	0,40	14,64	14,97	15,31	14,97	0,34	0,19
42	8	0,151	0,093	0,136	0,13	0,03	0,02	13,59	14,15	13,48	13,74	0,36	0,21
48	9	0,14	0,181	0,045	0,12	0,07	0,04		14,33		14,33	0,00	0,00
54	10	0,172	0,143	0,169	0,16	0,02	0,01	11,25	11,25	11,25	11,25	0,00	0,00
60	11	0,062	0,056	0,107	0,08	0,03	0,02	11,25	11,25	11,25	11,25	0,00	0,00
66	12							11,25			11,25	0,00	0,00

**Tabela 24:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 3 em YPDX 0,5%, em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento, além do fato de o HPLC não conseguir reconhecer bem os compostos da amostra quando uma concentração muito baixa.

	YPDX 0,5%												
Hrs	Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
0	1	4,857	4,725	5,213	4,93	0,25	0,15	13,75	13,41	14,67	13,94	0,65	0,38
6	2	3,549	3,499	3,618	3,56	0,06	0,03	13,11	13,03	13,49	13,21	0,25	0,14
12	3	1,071	1,227	0,733	1,01	0,25	0,15	12,5	12,45	12,5	12,48	0,03	0,02
18	4	0,054			0,05	0,00	0,00	11,28	11,37	11,77	11,47	0,26	0,15
24	5							11,62	11,51	11,56	11,56	0,06	0,03
30	6			0,068	0,07	0,00	0,00	11,38	11,49	11,15	11,34	0,17	0,10
36	7							11,5	11,28	10,51	11,10	0,52	0,30
42	8		0,097		0,10	0,00	0,00	10,59	10,35	9,861	10,27	0,37	0,21
48	9		0,098		0,10	0,00	0,00	10,3	10,46	9,432	10,06	0,55	0,32
54	10		0,102	0,098	0,10	0,00	0,00	10,41	9,521	8,759	9,56	0,82	0,48
60	11	0,112		0,077	0,09	0,02	0,01	8,565	9,1	8,5	8,72	0,33	0,19
66	12	0,109			0,11	0,00	0,00	9,002			9,00	0,00	0,00

**Tabela 25:** Concentrações dos açúcares glicose e xilose restantes no meio no momento das coletas de ponto das culturas de Po1g Transformante 3 em YPDX 1,5%, em g/L. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento, além do fato de o HPLC não conseguir reconhecer bem os compostos da amostra quando uma concentração muito baixa.

YPDX 1,5%												
Pto	1 Glic	2 Glic	3 Glic	MED	DP	EP	1 Xil	2 Xil	3 Xil	MED	DP	EP
1	14,45	13,96	12,88	13,76	0,80	0,46	6,379	6,14	5,719	6,08	0,33	0,19
2	12,44	11,9	12,27	12,20	0,28	0,16	6,101	5,922	6,097	6,04	0,10	0,06
3	8,82	8,899	9,303	9,01	0,26	0,15	5,476	5,538	5,615	5,54	0,07	0,04
4	3,722	3,556	4,292	3,86	0,39	0,22	4,941	4,78	4,897	4,87	0,08	0,05
5	2,542	2,553	2,518	2,54	0,02	0,01	4,709	4,698	4,593	4,67	0,06	0,04
6	3,354	1,445	1,368	2,06	1,12	0,65	4,686	4,599	4,592	4,63	0,05	0,03
7	2,336	0,642	0,565	1,18	1,00	0,58	4,682	4,299	4,541	4,51	0,19	0,11
8	1,425	0,155	0,083	0,55	0,75	0,44	4,408	3,298	2,954	3,55	0,76	0,44
9	0,11	0,167	0,104	0,13	0,03	0,02	3,469	2,985	2,81	3,09	0,34	0,20
10	0,145	0,136		0,14	0,01	0,00	2,832	2,426	1,87	2,38	0,48	0,28
11	0,121	0,106		0,11	0,01	0,01	2,846	2,329	1,824	2,33	0,51	0,30
12		0,048		0,05	0,00	0,00		2,383		2,38	0,00	0,00

**Tabela 26:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g nativa nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, e suas respectivas porcentagens de lipídeos em relação à massa seca. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados. Há algumas células em branco pois as amostras referentes a elas foram perdidas durante o tratamento.

MASSA LIPÍDICA NATIVA (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,015	0,013	0,013	0,014	0,001	0,001	0,015	0,013	0,014	0,014	0,001	0,001
72h	0,045	0,078	0,066	0,063	0,017	0,010						
120h	0,079	0,186	0,148	0,138	0,054	0,031	0,127	0,121	0,075	0,108	0,028	0,016
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,022	0,019	0,011	0,017	0,006	0,004	0,040	0,093	0,060	0,065	0,027	0,015
72h	0,081	0,043	0,063	0,063	0,019	0,011	0,093	0,084	0,088	0,088	0,005	0,003
120h	0,120	0,107	0,092	0,107	0,014	0,008	0,045	0,123	0,113	0,093	0,042	0,024
MASSA SECA TOTAL NATIVA (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,176	0,179	0,162	0,173	0,009	0,005	0,191	0,208	0,203	0,200	0,009	0,005
72h	0,209	0,221	0,210	0,213	0,007	0,004	0,199	0,091	0,132	0,141	0,055	0,031
120h	0,402	0,392	0,346	0,380	0,030	0,017	0,140	0,626	0,129	0,298	0,284	0,164
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,218	0,241	0,131	0,197	0,058	0,033	0,189	0,257	0,130	0,192	0,064	0,037
72h	0,603	0,356	0,379	0,446	0,136	0,079	0,254	0,228	0,275	0,253	0,023	0,014
120h	0,573	0,561	0,528	0,554	0,024	0,014	0,242	0,159	0,186	0,195	0,043	0,025
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	8,45%	7,31%	8,19%	7,99%	0,60%	0,34%	8,06%	6,36%	7,11%	7,18%	0,009	0,005
72h	21,63%	35,25%	31,51%	29,46%	7,04%	4,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,000	0,000
120h	19,69%	47,54%	42,80%	36,67%	14,90%	8,60%	90,79%	19,31%	58,49%	56,20%	0,358	0,207
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	10,24%	7,98%	8,00%	8,74%	1,30%	0,75%	21,40%	36,29%	46,44%	34,71%	0,126	0,073
72h	13,45%	12,18%	16,64%	14,09%	2,30%	1,33%	36,66%	36,90%	31,95%	35,17%	0,028	0,016
120h	20,95%	19,12%	17,46%	19,17%	1,74%	1,01%	18,66%	77,24%	60,61%	52,17%	0,302	0,174

**Tabela 27:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g transformante 1 nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, e suas respectivas porcentagens lipídicas em relação às massas secas. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA LIPÍDICA TRANSFORMANTE 1 (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,033	0,049	0,036	0,039	0,008	0,004	0,028	0,013	0,010	0,017	0,009	0,005
72h	0,087	0,079	0,060	0,075	0,014	0,008	0,019	0,023	0,013	0,018	0,005	0,002
120h	0,097	0,100	0,085	0,094	0,007	0,004	0,153	0,066	0,037	0,085	0,060	0,034
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,029	0,038	0,036	0,034	0,004	0,002	0,027	0,075	0,029	0,044	0,026	0,015
72h	0,046	0,040	0,045	0,044	0,003	0,001	0,070	0,094	0,088	0,084	0,012	0,007
120h	0,089	0,089	0,074	0,084	0,008	0,005	0,047	0,174	0,053	0,091	0,071	0,041
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 1 (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,245	0,137	0,166	0,182	0,055	0,032	0,051	0,058	0,057	0,055	0,003	0,002
72h	0,2245	0,273	0,162	0,219	0,055	0,032	0,136	0,100	0,100	0,112	0,020	0,011
120h	0,3721	0,49	0,36	0,407	0,071	0,041	0,502	0,489	0,472	0,487	0,014	0,008
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,0788	0,082	0,089	0,083	0,005	0,003	0,41	0,22	0,3	0,31	0,095	0,055
72h	0,3281	0,133	0,078	0,179	0,131	0,075	0,28	0,29	0,37	0,313	0,049	0,028
120h	0,8126	0,845	0,722	0,793	0,064	0,036	0,25	0,51	0,38	0,38	0,13	0,075
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MÉD	DP	EP
24h	13,55%	35,91%	21,93%	23,80%	11,30%	6,52%	54,79%	23,02%	17,82%	31,88%	0,200	0,116
72h	39,02%	29,23%	37,22%	35,16%	5,21%	3,01%	14,39%	23,23%	13,11%	16,91%	0,055	0,032
120h	26,15%	20,51%	23,72%	23,46%	2,83%	1,63%	30,51%	13,55%	8,03%	17,36%	0,117	0,068
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	37,94%	46,77%	40,91%	41,88%	4,49%	2,59%	6,76%	34,32%	9,97%	17,01%	0,151	0,087
72h	14,11%	30,43%	58,11%	34,22%	22,24%	12,84%	25,18%	32,59%	24,00%	27,25%	0,047	0,027
120h	11,05%	10,59%	10,29%	10,64%	0,38%	0,22%	18,96%	34,12%	14,18%	22,42%	0,104	0,060



**Tabela 28:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g transformante 2 nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, e sua respectiva porcentagem de lipídeos em relação à massa seca. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA LIPÍDICA TRANSFORMANTE 2 (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,039	0,043	0,033	0,038	0,005	0,003	0,02	0,017	0,015	0,017	0,002	0,001
72h	0,098	0,075	0,065	0,079	0,016	0,009	0,018	0,021	0,016	0,018	0,002	0,001
120h	0,092	0,101	0,083	0,092	0,009	0,005	0,164	0,063	0,039	0,089	0,066	0,038
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,021	0,035	0,030	0,028	0,007	0,004	0,025	0,073	0,037	0,045	0,024	0,014
72h	0,043	0,038	0,048	0,043	0,005	0,002	0,077	0,095	0,086	0,086	0,009	0,005
120h	0,080	0,084	0,077	0,080	0,003	0,002	0,040	0,139	0,057	0,078	0,052	0,030
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 2 (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,18	0,16	0,12	0,153	0,030	0,017	0,059	0,067	0,062	0,063	0,003	0,002
72h	0,22	0,24	0,19	0,216	0,025	0,014	0,141	0,123	0,105	0,123	0,018	0,010
120h	0,36	0,45	0,37	0,393	0,049	0,028	0,516	0,507	0,504	0,509	0,006	0,003
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,075	0,087	0,083	0,081	0,006	0,003	0,33	0,13	0,05	0,17	0,144	0,083
72h	0,366	0,121	0,079	0,189	0,155	0,089	0,21	0,26	0,29	0,25	0,040	0,023
120h	0,795	0,835	0,787	0,806	0,025	0,014	0,2	0,45	0,28	0,31	0,127	0,073
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	21,78%	27,44%	27,75%	25,66%	3,36%	1,94%	33,56%	25,89%	24,88%	28,11%	0,047	0,027
72h	44,59%	31,58%	34,21%	36,79%	6,88%	3,97%	12,93%	17,65%	15,79%	15,46%	0,024	0,014
120h	25,61%	22,60%	22,49%	23,57%	1,77%	1,02%	31,92%	12,44%	7,89%	17,42%	0,128	0,074
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	28,06%	40,55%	36,30%	34,97%	6,35%	3,67%	7,85%	56,54%	74,00%	46,13%	0,343	0,198
72h	11,82%	31,68%	61,01%	34,84%	24,75%	14,29%	36,81%	36,85%	29,83%	34,49%	0,040	0,023
120h	10,09%	10,14%	9,83%	10,02%	0,17%	0,10%	20,05%	30,91%	20,46%	23,81%	0,062	0,036

**Tabela 29:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g transformante 3 nos meios YPD, YPX, YPDX 0,5% e YPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA LIPÍDICA TRANSFORMANTE 3 (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,036	0,047	0,038	0,041	0,006	0,003	0,017	0,019	0,017	0,018	0,001	0,001
72h	0,093	0,078	0,061	0,077	0,016	0,009	0,018	0,023	0,015	0,018	0,004	0,002
120h	0,092	0,125	0,080	0,099	0,023	0,013	0,174	0,072	0,029	0,092	0,075	0,043
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,026	0,030	0,038	0,031	0,006	0,004	0,026	0,079	0,036	0,047	0,028	0,016
72h	0,049	0,033	0,049	0,044	0,009	0,005	0,072	0,095	0,088	0,085	0,012	0,007
120h	0,082	0,089	0,073	0,081	0,008	0,005	0,048	0,163	0,054	0,088	0,065	0,037
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 3 (g)												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	0,170	0,132	0,095	0,132	0,037	0,022	0,064	0,060	0,065	0,063	0,003	0,002
72h	0,225	0,197	0,235	0,219	0,020	0,011	0,189	0,176	0,095	0,154	0,051	0,029
120h	0,357	0,407	0,387	0,384	0,026	0,015	0,454	0,500	0,587	0,514	0,068	0,039
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,071	0,078	0,073	0,074	0,004	0,002	0,260	0,150	0,060	0,157	0,100	0,058
72h	0,379	0,121	0,083	0,194	0,161	0,093	0,170	0,220	0,340	0,243	0,087	0,050
120h	0,796	0,834	0,734	0,788	0,051	0,029	0,260	0,300	0,290	0,283	0,021	0,012
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YPD 1	YPD 2	YPD 3	MED	DP	EP	YPX 1	YPX 2	YPX 3	MED	DP	EP
24h	21,31%	35,76%	40,11%	32,39%	9,84%	5,68%	26,77%	31,21%	26,30%	28,09%	0,027	0,016
72h	41,33%	39,70%	26,00%	35,68%	8,42%	4,86%	9,26%	12,76%	15,93%	12,65%	0,033	0,019
120h	25,83%	30,69%	20,72%	25,75%	4,98%	2,88%	38,41%	14,41%	4,96%	19,26%	0,172	0,100
Pto	YPDX 0,5 1	YPDX 0,5 2	YPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YPDX 1,5 1	YPDX 1,5 2	YPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	36,66%	37,82%	52,19%	42,22%	8,65%	5,00%	10,15%	52,93%	60,00%	41,03%	0,270	0,156
72h	12,83%	27,31%	58,87%	33,01%	23,54%	13,59%	42,59%	43,14%	25,91%	37,21%	0,098	0,057
120h	10,25%	10,70%	9,89%	10,28%	0,41%	0,23%	18,54%	54,33%	18,52%	30,46%	0,207	0,119

**Tabela 30:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g nativa nos meios YnPD, YnPX, YnPDX 0,5% e YnPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, e a porcentagem de lipídeos em relação à massa seca total. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA LIPÍDICANATIVA (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,018	0,015	0,028	0,020	0,007	0,004	0,003	0,004	0,001	0,003	0,001	0,001
72h	0,035	0,034	0,038	0,036	0,002	0,001	0,017	0,019	0,048	0,028	0,017	0,010
120h	0,050	0,106	0,086	0,080	0,028	0,016	0,016	0,012	0,045	0,025	0,018	0,010
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,017	0,037	0,018	0,024	0,011	0,007	0,013	0,014	0,012	0,013	0,001	0,001
72h	0,060	0,088	0,071	0,073	0,014	0,008	0,026	0,026	0,027	0,026	0,000	0,000
120h	0,112	0,103	0,129	0,115	0,014	0,008	0,073	0,074	0,079	0,075	0,003	0,002
MASSA SECA TOTAL NATIVA (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,045	0,017	0,120	0,060	0,053	0,031	0,008	0,004	0,009	0,007	0,002	0,001
72h	0,095	0,083	0,079	0,086	0,009	0,005	0,054	0,054	0,061	0,056	0,004	0,002
120h	0,164	0,942	0,090	0,399	0,472	0,272	0,055	0,056	0,065	0,059	0,006	0,003
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,075	0,067	0,079	0,074	0,006	0,003	0,094	0,110	0,088	0,097	0,011	0,007
72h	0,136	0,129	0,116	0,127	0,010	0,006	0,115	0,045	0,094	0,085	0,036	0,021
120h	0,158	0,182	0,284	0,208	0,067	0,039	0,172	0,162	0,146	0,160	0,013	0,008
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	40,49%	85,80%	23,49%	49,93%	0,322	0,185	33,33%	81,82%	13,48%	42,88%	0,351	0,202
72h	36,83%	40,17%	48,73%	41,91%	0,061	0,035	31,59%	35,82%	78,13%	48,51%	0,257	0,148
120h	30,20%	11,20%	95,23%	45,54%	0,440	0,254	28,88%	21,82%	69,53%	40,08%	0,257	0,148
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	22,33%	55,36%	23,28%	33,66%	0,188	0,108	13,98%	12,69%	13,57%	13,41%	0,006	0,003
72h	44,40%	68,03%	61,47%	57,97%	0,122	0,070	22,54%	57,56%	28,33%	36,14%	0,187	0,108
120h	70,85%	56,29%	45,48%	57,54%	0,127	0,073	42,16%	45,40%	54,16%	47,24%	0,062	0,035

**Tabela 31:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g transformante 1 nos meios YnPD, YnPX, YnPDX 0,5% e YnPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, em conjunto com as porcentagens lipídicas de cada crescimento em relação com as massas secas totais. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA LIPÍDICA TRANSFORMANTE 1 (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,031	0,026	0,040	0,032	0,007	0,004	0,002	0,003	0,004	0,003	0,001	0,001
72h	0,049	0,043	0,052	0,048	0,004	0,003	0,017	0,017	0,018	0,017	0,001	0,001
120h	0,036	0,103	0,087	0,075	0,035	0,020	0,037	0,033	0,036	0,036	0,002	0,001
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,014	0,024	0,041	0,026	0,013	0,008	0,010	0,010	0,009	0,009	0,001	0,000
72h	0,064	0,067	0,065	0,065	0,001	0,001	0,025	0,041	0,047	0,038	0,011	0,006
120h	0,079	0,079	0,070	0,076	0,005	0,003	0,076	0,075	0,081	0,077	0,003	0,002
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 1 (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,102	0,090	0,100	0,097	0,006	0,004	0,007	0,006	0,006	0,006	0,001	0,000
72h	0,120	0,131	0,152	0,134	0,016	0,009	0,052	0,051	0,037	0,047	0,009	0,005
120h	0,100	0,120	0,280	0,167	0,099	0,057	0,062	0,054	0,058	0,058	0,004	0,002
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,082	0,091	0,077	0,083	0,007	0,004	0,046	0,058	0,050	0,051	0,006	0,003
72h	0,121	0,145	0,099	0,122	0,023	0,013	0,139	0,153	0,139	0,143	0,008	0,005
120h	0,138	0,145	0,133	0,139	0,006	0,003	0,146	0,200	0,150	0,165	0,030	0,017
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	29,90%	29,33%	40,02%	33,09%	0,060	0,035	25,37%	42,62%	67,27%	45,09%	0,211	0,122
72h	40,58%	32,90%	34,14%	35,88%	0,041	0,024	31,92%	33,92%	50,27%	38,71%	0,101	0,058
120h	35,50%	86,17%	31,07%	50,91%	0,306	0,177	59,26%	62,08%	63,08%	61,48%	0,020	0,011
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	17,54%	26,04%	53,12%	32,23%	0,186	0,107	21,43%	16,64%	17,80%	18,62%	0,025	0,014
72h	52,72%	46,13%	66,13%	54,99%	0,102	0,059	18,31%	26,54%	33,50%	26,12%	0,076	0,044
120h	56,80%	54,80%	52,68%	54,76%	0,021	0,012	52,10%	37,63%	53,66%	47,80%	0,088	0,051

**Tabela 32:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g transformante 2 nos meios YnPD, YnPX, YnPDX 0,5% e YnPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, em conjunto com as porcentagens lipídicas de cada crescimento em relação com as massas secas totais. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA DE LIPÍDEOS TRANSFORMANTE 2 (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,038	0,022	0,040	0,033	0,010	0,006	0,003	0,002	0,003	0,002	0,001	0,000
72h	0,046	0,047	0,054	0,049	0,004	0,003	0,019	0,014	0,014	0,016	0,003	0,002
120h	0,030	0,101	0,092	0,074	0,038	0,022	0,029	0,033	0,032	0,031	0,002	0,001
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,013	0,028	0,045	0,029	0,016	0,009	0,010	0,009	0,009	0,009	0,001	0,000
72h	0,062	0,061	0,068	0,064	0,004	0,002	0,023	0,038	0,046	0,035	0,012	0,007
120h	0,071	0,075	0,072	0,072	0,002	0,001	0,079	0,072	0,084	0,079	0,006	0,004
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 2 (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,102	0,090	0,100	0,097	0,006	0,004	0,006	0,005	0,006	0,006	0,001	0,000
72h	0,120	0,131	0,152	0,134	0,016	0,009	0,043	0,043	0,034	0,040	0,005	0,003
120h	0,060	0,170	0,260	0,163	0,100	0,058	0,056	0,058	0,057	0,057	0,001	0,001
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,077	0,082	0,099	0,086	0,011	0,007	0,054	0,046	0,045	0,048	0,005	0,003
72h	0,103	0,139	0,119	0,121	0,018	0,010	0,158	0,104	0,085	0,116	0,038	0,022
120h	0,138	0,145	0,103	0,129	0,022	0,013	0,139	0,172	0,156	0,156	0,017	0,010
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	36,96%	24,78%	40,02%	33,92%	0,081	0,047	48,28%	28,30%	41,27%	39,28%	0,101	0,059
72h	38,00%	36,03%	35,53%	36,52%	0,013	0,008	43,26%	32,17%	42,86%	39,43%	0,063	0,036
120h	50,33%	59,18%	35,38%	48,30%	0,120	0,069	52,14%	56,53%	55,69%	54,79%	0,023	0,013
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	17,36%	33,90%	45,35%	32,20%	0,141	0,081	18,28%	19,05%	21,12%	19,48%	0,015	0,008
72h	60,15%	43,96%	57,21%	53,78%	0,086	0,050	14,47%	36,21%	53,46%	34,71%	0,195	0,113
120h	51,01%	51,76%	69,22%	57,33%	0,103	0,059	57,22%	41,89%	53,84%	50,98%	0,080	0,046

**Tabela 33:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g transformante 3 nos meios YnPD, YnPX, YnPDX 0,5% e YnPDX 1,5% ao longo de 120 horas, em gramas, em conjunto com as porcentagens lipídicas de cada crescimento em relação com as massas secas totais. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

MASSA DE LIPÍDEOS TRANSFORMANTE 3 (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,038	0,025	0,049	0,037	0,012	0,007	0,002	0,001	0,002	0,002	0,000	0,000
72h	0,040	0,050	0,051	0,047	0,006	0,004	0,020	0,014	0,020	0,018	0,003	0,002
120h	0,087	0,099	0,082	0,089	0,009	0,005	0,029	0,031	0,035	0,032	0,003	0,002
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,016	0,028	0,046	0,030	0,015	0,009	0,009	0,008	0,009	0,009	0,000	0,000
72h	0,066	0,063	0,062	0,064	0,002	0,001	0,023	0,031	0,047	0,034	0,012	0,007
120h	0,079	0,080	0,072	0,077	0,004	0,002	0,071	0,072	0,083	0,075	0,006	0,004
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 3 (g)												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	0,089	0,100	0,106	0,098	0,009	0,005	0,008	0,005	0,008	0,007	0,002	0,001
72h	0,090	0,102	0,123	0,105	0,017	0,010	0,050	0,038	0,037	0,041	0,007	0,004
120h	0,280	0,110	0,250	0,213	0,091	0,052	0,059	0,058	0,053	0,057	0,003	0,002
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	0,079	0,070	0,087	0,079	0,009	0,005	0,042	0,049	0,055	0,048	0,006	0,004
72h	0,118	0,123	0,117	0,119	0,004	0,002	0,128	0,165	0,063	0,119	0,052	0,030
120h	0,139	0,147	0,107	0,131	0,021	0,012	0,117	0,190	0,159	0,155	0,037	0,021
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA												
Pto	YnPD 1	YnPD 2	YnPD 3	MED	DP	EP	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	MED	DP	EP
24h	43,15%	24,98%	46,23%	38,12%	0,115	0,066	27,63%	26,67%	22,37%	25,56%	0,028	0,016
72h	44,22%	48,73%	41,71%	44,89%	0,036	0,021	39,76%	37,23%	53,66%	43,55%	0,088	0,051
120h	31,07%	89,82%	32,92%	51,27%	0,334	0,193	48,89%	54,36%	66,23%	56,49%	0,089	0,051
Pto	YnPDX 0,5 1	YnPDX 0,5 2	YnPDX 0,5 3	MED	DP	EP	YnPDX 1,5 1	YnPDX 1,5 2	YnPDX 1,5 3	MED	DP	EP
24h	20,76%	39,29%	52,99%	37,68%	0,162	0,093	20,67%	16,84%	15,78%	17,76%	0,026	0,015
72h	55,92%	51,38%	53,13%	53,48%	0,023	0,013	17,84%	18,89%	74,68%	37,14%	0,325	0,188
120h	57,29%	54,14%	67,76%	59,73%	0,071	0,041	61,10%	38,07%	51,98%	50,38%	0,116	0,067

**Tabela 34:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g Nativa com seis replicatas nos meios YPX, YnPX, YPDX 0,5% e YnPDx 0,5% após 120 horas, em gramas, em conjunto com as porcentagens lipídicas de cada crescimento em relação com as massas secas totais. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

PRODUÇÃO LIPÍDEOS NATIVA									
Pto	YPX 1	YPX 2	YPX 3	YPX 4	YPX 5	YPX 6	MED	DP	EP
120h	0,0636	0,0327	0,0563	0,0379	0,0549	0,0419	0,0479	0,0121	0,0049
Pto	YPDX 1	YPDX 2	YPDX 3	YPDX 4	YPDX 5	YPDX 6	MED	DP	EP
120h	0,0395	0,0377	0,0618	0,0562	0,0666	0,0440	0,0510	0,0122	0,0050
Pto	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	YnPX 4	YnPX 5	YnPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0077	0,0049	0,0037	0,0081	0,0011	0,0055	0,0052	0,0026	0,0011
Pto	YnPDx 1	YnPDx 2	YnPDx 3	YnPDx 4	YnPDx 5	YnPDx 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0052	0,0065	0,0110	0,0051	0,0052	0,0076	0,0068	0,0023	0,0009
MASSA SECA TOTAL NATIVA									
Pto	YPX 1	YPX 2	YPX 3	YPX 4	YPX 5	YPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,2905	0,3088	0,5036	0,5345	0,5200	0,4356	0,4322	0,1082	0,0442
Pto	YPDX 1	YPDX 2	YPDX 3	YPDX 4	YPDX 5	YPDX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,3889	0,3433	0,1926	0,2621	0,3160	0,3152	0,3030	0,0681	0,0278
Pto	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	YnPX 4	YnPX 5	YnPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0293	0,0222	0,0236	0,0185	0,0191	0,0193	0,0220	0,0041	0,0017
Pto	YnPDx 1	YnPDx 2	YnPDx 3	YnPDx 4	YnPDx 5	YnPDx 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0149	0,0147	0,0130	0,0170	0,0158	0,0150	0,0151	0,0013	0,0005
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA									
Meio	1	2	3	4	5	6	MED	DP	EP
YPX s	21,89%	10,59%	11,18%	7,09%	10,56%	9,62%	11,82%	0,051	0,021
YPDX 0,5 s	10,16%	10,98%	32,09%	21,44%	21,08%	13,96%	18,28%	0,083	0,0340
YNX s	26,28%	22,07%	15,68%	43,78%	5,76%	28,50%	23,68%	0,128	0,052
YNDX 0,5 s	34,90%	44,22%	84,62%	30,00%	32,91%	50,67%	46,22%	0,203	0,083

**Tabela 35:** Massa lipídica e massa seca total extraídas do crescimento de Po1g Transformante 1 com seis replicatas nos meios YPX, YnPX, YPDX 0,5% e YnPDx 0,5% após 120 horas, em gramas, em conjunto com as porcentagens lipídicas de cada crescimento em relação com as massas secas totais. MED significa Média Aritmética entre os valores anotados, DP é o Desvio Padrão entre os valores anotados e EP é o Erro Padrão entre os valores anotados.

PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS TRANSFORMANTE 1									
Pto	YPX 1	YPX 2	YPX 3	YPX 4	YPX 5	YPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0583	0,0443	0,0463	0,0583	0,0295	0,0124	0,0415	0,0178	0,0073
Pto	YPDX 1	YPDX 2	YPDX 3	YPDX 4	YPDX 5	YPDX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0361	0,0487	0,0666	0,0641	0,0186	0,0505	0,0474	0,0180	0,0073
Pto	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	YnPX 4	YnPX 5	YnPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0140	0,0108	0,0101	0,0119	0,0244	0,0102	0,0136	0,0055	0,0022
Pto	YnPDx 1	YnPDx 2	YnPDx 3	YnPDx 4	YnPDx 5	YnPDx 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0293	0,0234	0,0204	0,0295	0,0217	0,0203	0,0241	0,0043	0,0017
MASSA SECA TOTAL TRANSFORMANTE 1									
Pto	YPX 1	YPX 2	YPX 3	YPX 4	YPX 5	YPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,3008	0,4834	0,2757	0,2904	0,2114	0,1708	0,2888	0,1078	0,0440
Pto	YPDX 1	YPDX 2	YPDX 3	YPDX 4	YPDX 5	YPDX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,2430	0,2010	0,2421	0,2270	0,2227	0,2417	0,2296	0,0165	0,0067
Pto	YnPX 1	YnPX 2	YnPX 3	YnPX 4	YnPX 5	YnPX 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0216	0,0196	0,0191	0,0221	0,0210	0,0220	0,0209	0,0013	0,0005
Pto	YnPDx 1	YnPDx 2	YnPDx 3	YnPDx 4	YnPDx 5	YnPDx 6	MÉD	DP	EP
120h	0,0792	0,0896	0,0836	0,0821	0,0869	0,0866	0,0847	0,0038	0,0015
PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA									
Meio	1	2	3	4	5	6	MED	DP	EP
YPX	6,27%	4,77%	8,14%	5,94%	6,55%	19,65%	8,55%	0,05	0,02
YPDX 0,5%	10,18%	8,92%	9,33%	9,39%	9,43%	12,46%	9,95%	0,01	0,00
YnPX	64,81%	55,10%	52,88%	53,85%	116,19%	46,36%	64,87%	0,26	0,11
YnPDx 0,5%	36,99%	26,12%	24,40%	35,93%	24,97%	23,44%	28,64%	0,06	0,02





## INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto 2016/05 - Desenvolvimento de linhagens de leveduras de interesse industrial através da expressão heteróloga de genes-alvo e engenharia evolutiva, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Fábio Papes, assim como o sub-projeto Desenvolvimento de uma linhagem geneticamente modificada de *Yarrowia lipolytica* para consumo de xilose através da super-expressão do gene de xilose isomerase de *Piromyces*, do pós-graduando Mateus da Rosa Nunes Paiva, encontram-se devidamente aprovados e regularizados junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",

16 de janeiro de 2017.

Profa. Dra. HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA

Presidente da CIBio

Instituto de Biologia - UNICAMP

## Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desenvolvimento de uma linhagem geneticamente modificada de *Yarrowia lipolytica* para consumo de xilose através da super-expressão do gene de xilose isomerase de *Piromyces***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28/03/2017

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Mateus da Rosa Nunes Paiva**

RG n.º 49.048.806-7

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): **Fabio Papes**

RG n.º 26.721.749-3